



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 101 30 192.8

Anmeldetag: 22. Juni 2001

Anmelder/Inhaber: Degussa AG, Düsseldorf/DE

Bezeichnung: Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von Stämmen der Familie Enterobacteriaceae

Priorität: 30.09.2000 DE 100 48 605.3
09.11.2000 DE 100 55 516.0

IPC: C 12 N, C.07 H, C 12 P

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 2. August 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Jerofsky

**Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren
unter Verwendung von Stämmen der Familie Enterobacteriaceae**

Diese Erfindung betrifft ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin,
5 unter Verwendung von Stämmen der Familie Enterobacteriaceae, in denen zumindest das pckA-Gen abgeschwächt wird.

Stand der Technik

L-Aminosäuren finden in der Tierernährung, in der
10 Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie Anwendung.

Es ist bekannt L-Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen der Enterobacteriaceae, insbesondere Escherichia coli und Serratia marcescens, herzustellen. Wegen der großen
15 Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen, wie z.B. Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie z.B. die Zuckerkonzentration während der
20 Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform, durch z.B. Ionenaustauschchromatographie, oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser
25 Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite wie z.B. das Threonin-Analogon α -Amino- β -Hydroxyvaleriansäure (AHV) oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und
30 L-Aminosäuren wie z.B. L-Threonin produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung L-Aminosäuren produzierender Stämme der Familie Enterobacteriaceae eingesetzt, indem man einzelne

Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Produktion untersucht.

Aufgabe der Erfindung

- 5 Die Erfinder haben sich die Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

- 10 Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, unter Verwendung von Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, die insbesondere bereits L-Threonin produzieren, und in denen die für das Enzym
15 Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEP-Carboxykinase) (EC 4.1.1.49) kodierende Nukleotidsequenz (pckA-Gen) abgeschwächt wird.

- Werden im folgenden L-Aminosäuren oder Aminosäuren erwähnt, sind damit eine oder mehrere Aminosäuren einschließlich
20 ihrer Salze, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan, L-Homoserin und L-Arginin gemeint. Besonders bevorzugt ist
25 L-Threonin.

- Der Begriff „Abschwächung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die
30 entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise einen schwachen Promotor oder ein Gen bzw. Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer niedrigen

Aktivität kodiert bzw. das entsprechende Enzym (Protein) inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß man folgende Schritte durchführt:

- 5 a) Fermentation von Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, in denen zumindest das pckA-Gen abgeschwächt wird,
- b) Anreicherung der entsprechenden L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Mikroorganismen der
10 Familie Enterobacteriaceae, und
- c) Isolieren der gewünschten L-Aminosäure.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Aminosäuren aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse,
15 gegebenenfalls Stärke, gegebenenfalls Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es handelt sich um Vertreter der Familie Enterobacteriaceae, ausgewählt aus den Gattungen Escherichia, Erwinia, Providencia und Serratia. Die Gattungen Escherichia und Serratia werden
20 bevorzugt. Bei der Gattung Escherichia ist insbesondere die Art Escherichia coli und bei der Gattung Serratia insbesondere die Art Serratia marcescens zu nennen.

Geeignete, insbesondere L-Threonin produzierende Stämme der Gattung Escherichia, insbesondere der Art Escherichia coli
25 sind beispielsweise

Escherichia coli TF427
Escherichia coli H4578
Escherichia coli KY10935
Escherichia coli VNIIGenetika MG442
30 Escherichia coli VNIIGenetika M1
Escherichia coli VNIIGenetika 472T23
Escherichia coli BKIIM B-3996
Escherichia coli kat 13
Escherichia coli KCCM-10132

Geeignete L-Threonin produzierende Stämme der Gattung *Serratia*, insbesondere der Art *Serratia marcescens* sind beispielsweise

- 5 *Serratia marcescens* HNr21
- Serratia marcescens* TLr156
- Serratia marcescens* T2000

L-Threonin produzierende Stämme aus der Familie der Enterobacteriaceae besitzen bevorzugt unter anderen ein oder mehrere der genetischen bzw. phänotypischen Merkmale

10 ausgewählt aus der Gruppe: Resistenz gegen α -Amino- β -Hydroxyvaleriansäure, Resistenz gegen Thialysin, Resistenz gegen Ethionin, Resistenz gegen α -Methylserin, Resistenz gegen Diaminovernsteinsäure, Resistenz gegen α -Aminobuttersäure, Resistenz gegen Borrelidin, Resistenz

15 gegen Rifampicin, Resistenz gegen Valin-Analoga wie beispielsweise Valinhydroxamat, Resistenz gegen Purinanaloga wie beispielsweise 6-Dimethylaminopurin, Bedürftigkeit für L-Methionin, gegebenenfalls partielle und kompensierbare Bedürftigkeit für L-Isoleucin, Bedürftigkeit

20 für meso-Diaminopimelinsäure, Auxotrophie bezüglich Threonin-haltiger Dipeptide, Resistenz gegen L-Threonin, Resistenz gegen L-Homoserin, Resistenz gegen L-Lysin, Resistenz gegen L-Methionin, Resistenz gegen L-Glutaminsäure, Resistenz gegen L-Aspartat, Resistenz gegen

25 L-Leucin, Resistenz gegen L-Phenylalanin, Resistenz gegen L-Serin, Resistenz gegen L-Cystein, Resistenz gegen L-Valin, Empfindlichkeit gegenüber Fluoropyruvat, defekte Threonin-Dehydrogenase, gegebenenfalls Fähigkeit zur Saccharose-Verwertung, Verstärkung des Threonin-Operons,

30 Verstärkung der Homoserin-Dehydrogenase I-Aspartatkinase I bevorzugt der feed back resistenten Form, Verstärkung der Homoserinkinase, Verstärkung der Threoninsynthase, Verstärkung der Aspartatkinase, gegebenenfalls der feed back resistenten Form, Verstärkung der Aspartatsemialdehyd-

35 Dehydrogenase, Verstärkung der Phosphoenolpyruvat-

Carboxylase, gegebenenfalls der feed back resistenten Form, Verstärkung der Phosphoenolpyruvat-Synthase, Verstärkung der Transhydrogenase, Verstärkung des RhtB-Genproduktes, Verstärkung des RhtC-Genproduktes, Verstärkung des YfiK-
5 Genproduktes, Verstärkung der Malat:Chinon Oxidoreduktase und Verstärkung einer Pyruvat-Carboxylase und Abschwächung der Essigsäurebildung.

Es wurde gefunden, daß Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae nach Abschwächung, insbesondere
10 Ausschaltung des für die PEP-Carboxykinase (EC 4.1.1.49) kodierenden pckA-Gens in verbesserter Weise L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin produzieren.

Die Nukleotidsequenz des pckA-Gens von Escherichia coli wurde von Medina et al. (Journal of Bacteriology 172, 7151-
15 7156 (1990) publiziert und kann ebenfalls der von Blattner et al. (Science 277, 1453 - 1462 (1997) publizierten Genomsequenz von Escherichia coli entnommen werden. Die Nukleotidsequenz des pckA-Gens von Escherichia coli ist in SEQ ID No. 1 und die Aminosäuresequenz des dazugehörigen
20 Genproduktes in SEQ ID No. 2 dargestellt.

Die in den angegebenen Textstellen beschriebenen pckA-Gene können erfindungsgemäß verwendet werden. Weiterhin können Allele des pckA-Gens verwendet werden, die sich aus der Degeneriertheit des genetischen Codes oder durch
25 funktionsneutrale Sinnmutationen (sense mutations) ergeben.

Zur Erzielung einer Abschwächung können beispielsweise die Expression des pckA-Gens oder die katalytischen Eigenschaften des Enzymproteins herabgesetzt bzw. ausgeschaltet werden. Gegebenenfalls können beide Maßnahmen
30 kombiniert werden.

Die Verringerung der Genexpression kann durch geeignete Kulturführung, durch genetische Veränderung (Mutation) der Signalstrukturen der Genexpression oder auch durch Antisense-RNA Technik erfolgen. Signalstrukturen der
35 Genexpression sind beispielsweise Repressorgene,

Aktivatorgene, Operatoren, Promotoren, Attenuatoren, Ribosomenbindungsstellen, das Startkodon und Terminatoren. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem beispielsweise bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191-195 (1998)), bei Carrier und Keasling (Biotechnology Progress 15, 58-64 (1999), Franch und Gerdes (Current Opinion in Microbiology 3, 159-164 (2000)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie beispielsweise dem Lehrbuch von Knippers („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995) oder dem von Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990).

Mutationen, die zu einer Veränderung bzw. Herabsetzung der katalytischen Eigenschaften von Enzymproteinen führen, sind aus dem Stand der Technik bekannt. Als Beispiele seien die Arbeiten von Qiu und Goodman (Journal of Biological Chemistry 272: 8611-8617 (1997)), Yano et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA 95, 5511-5515 (1998)), Wente und Schachmann (Journal of Biological Chemistry 266, 20833-20839 (1991) genannt. Zusammenfassende Darstellungen können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z. B. dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

Als Mutationen kommen Transitionen, Transversionen, Insertionen und Deletionen in Betracht. In Abhängigkeit von der Wirkung des Aminosäureaustausches auf die Enzymaktivität wird von Fehlsinnmutationen (missense mutations) oder Nichtsinnmutationen (nonsense mutations) gesprochen. Insertionen oder Deletionen von mindestens einem Basenpaar in einem Gen führen zu Rasterverschiebungsmutationen (frame shift mutations), die dazu führen, daß falsche Aminosäuren eingebaut werden oder die Translation vorzeitig abbricht. Deletionen von mehreren Kodonen führen typischerweise zu einem vollständigen Ausfall der Enzymaktivität. Anleitungen zur Erzeugung

derartiger Mutationen gehören zum Stand der Technik und können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z. B. dem Lehrbuch von Knippers („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995), dem von Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990) oder dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

Ein Beispiel für ein Plasmid, mit Hilfe dessen das pckA-Gen von *Escherichia coli* durch ortsspezifische Mutagenese abgeschwächt, insbesondere ausgeschaltet werden kann, ist das Plasmid pMAK705 Δ pckA (Figur 1). Es enthält lediglich einen Teil der 5'- und einen Teil der 3'-Region des pckA-Gens. Ein 349 bp langer Abschnitt der Kodierregion fehlt (Deletion). Die Sequenz dieser für die Mutagenese des pckA-Gens einsetzbaren DNA ist in SEQ ID No. 3 dargestellt.

Die Deletionsmutation des pckA-Gens kann durch Gen- bzw. Allelaustausch in geeignete Stämme eingebaut werden.

Eine gebräuchliche Methode ist die von Hamilton et al. (Journal of Bacteriology 174, 4617 - 4622 (1989)) beschriebene Methode des Genaustauschs mit Hilfe eines konditional replizierenden pSC101-Derivates pMAK705. Andere im Stand der Technik beschriebene Methoden wie beispielsweise die von Martinez-Morales et al. (Journal of Bacteriology 199, 7143-7148 (1999)) oder die von Boyd et al. (Journal of Bacteriology 182, 842-847 (2000)) können ebenfalls benutzt werden.

Nach erfolgtem Austausch liegt in dem betreffenden Stamm die in SEQ ID No. 4 dargestellte Form des Δ pckA-Allels vor, die ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist.

Es ist ebenfalls möglich, Mutationen im pckA-Gen oder Mutationen, die die Expression des pckA-Gens betreffen, durch Konjugation oder Transduktion in verschiedene Stämme zu überführen.

Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin mit Stämmen der Familie Enterobacteriaceae vorteilhaft sein, zusätzlich zur Abschwächung des pckA-Gens ein oder mehrere Enzyme des
5 bekannten Threonin-Biosyntheseweges oder Enzyme des anaplerotischen Stoffwechsels oder Enzyme für die Produktion von reduziertem Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat zu verstärken.

Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang
10 die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme bzw. Proteine in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor oder ein Gen verwendet, das
15 für ein entsprechendes Enzym bzw. Protein mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

So können beispielsweise gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- 20 • das für die Aspartatkinase, die Homoserin-Dehydrogenase, die Homoserinkinase und die Threoninsynthase kodierende thrABC-Operon (US-A-4,278,765),
- 25 • das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende pyc-Gen (DE-A-19 831 609),
- das für die Phosphoenolpyruvat-Synthase kodierende pps-Gen (Molecular and General Genetics 231:332 (1992)),
- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase kodierende ppc-Gen (Gene 31:279-283 (1984)),
- 30 • die für die Transhydrogenase kodierenden Gene pntA und pntB (European Journal of Biochemistry 158:647-653 (1986)),

- das Homoserinresistenz vermittelnde Gen *rhtB* (EP-A-0994190),
- das Threoninresistenz vermittelnde Gen *rhtC* (EP-A-1013765),
- 5 • das für die Glutamat-Dehydrogenase kodierende *gdhA*-Gen (Gene 27:193-199 (1984))

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin vorteilhaft sein, zusätzlich zur
10 Abschwächung des *pckA*-Gens eines oder mehrere der Gene ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Threonin-Dehydrogenase kodierende *tdh*-Gen (Ravnikar und Somerville, Journal of Bacteriology 169, 4716-4721 (1987)),
- 15 • das für die Malat-Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.37) kodierende *mdh*-Gen (Vogel et al., Archives in Microbiology 149, 36-42 (1987)),
- das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) *yjfA* (Accession Number AAC77180 des National Center for
20 Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA) und SEQ ID No. 5)
- das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) *ytfP* (Accession Number AAC77179 des National Center for
25 Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA) und SEQ ID No. 5)

abzuschwächen, insbesondere auszuschalten oder die Expression zu verringern.

Die Abschwächung des offenen Leserahmens *yjfA* und/oder des offenen Leserahmens *ytfP* wird bevorzugt.

- 30 Es ist erfindungsgemäß ebenfalls möglich, die offenen Leserahmen *yjfA* und/oder *ytfP* unabhängig vom *pckA*-Gen

abzuschwächen, um zu einer Verbesserung der Aminosäuren, insbesondere der L-Threonin-Produktion zu gelangen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist dementsprechend ein Verfahren dadurch gekennzeichnet, daß man folgende

5 Schritte durchführt:

- d) Fermentation von Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, in denen zumindest der offene Leserahmen yjfA und/oder ytfP abgeschwächt wird,
- 10 e) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, und
- f) Isolieren des L-Threonins, wobei man gegebenenfalls Bestandteile der Fermentationsbrühe und die Biomasse in ihrer Gesamtheit oder zum Teil zusammen
15 mit der L-Aminosäure als festes Produkt isoliert.

Ein Beispiel für ein Plasmid, mit Hilfe dessen die offenen Leserahmen yjfA und ytfP von Escherichia coli durch ortsspezifische Mutagenese abgeschwächt, insbesondere ausgeschaltet werden können, ist das Plasmid pMAK705ΔyjfA
20 (Figur 2). Es enthält lediglich die 5'- und die 3'-Flanke der ytfP-yjfA Region einschließlich sehr kurzer Reste der offenen Leserahmen yjfA und ytfP. Ein 337 bp langer Teil der ytfP-yjfA Region fehlt (Deletion). Die Sequenz dieser für die Mutagenese der ytfP-yjfA Region einsetzbaren DNA
25 ist in SEQ ID No. 6 dargestellt.

Ein weiteres Beispiel für ein Plasmid, mit Hilfe dessen die offenen Leserahmen yjfA und ytfP von Escherichia coli durch ortsspezifische Mutagenese abgeschwächt, insbesondere ausgeschaltet werden können, ist das Plasmid pMAK705Δ90bp
30 (Figur 5). Es enthält ebenfalls lediglich die 5'- und die 3'-Flanke der ytfP-yjfA Region einschließlich sehr kurzer Reste der offenen Leserahmen yjfA und ytfP. Ein 90 bp langer Teil der ytfP-yjfA Region fehlt (Deletion). Die

Sequenz dieser für die Mutagenese der ytfP-yjfa Region einsetzbaren DNA ist in SEQ ID No. 7 dargestellt.

Diese Deletionsmutation kann durch Gen- bzw. Allelaustausch in geeignete Stämme eingebaut werden. Es ist ebenfalls
5 möglich, Mutationen in den offenen Leserahmen yjfa und/oder ytfP oder Mutationen, die die Expression dieser offenen Leserahmen betreffen, durch Konjugation oder Transduktion in verschiedene Stämme zu überführen.

Nach erfolgtem Austausch liegt in dem betreffenden Stamm
10 die in SEQ ID No. 6 oder SEQ ID No. 7 dargestellte Form des Δ ytfP- und des Δ yjfa- Allels vor, die ebenfalls Gegenstand der Erfindung sind.

Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin vorteilhaft sein, zusätzlich zur
15 einzelnen oder gemeinsamen Abschwächung des pckA-Gens oder der offenen Leserahmen yjfa und/oder ytfP unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms", in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.),
20 Academic Press, London, UK, 1982).

Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von
25 Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

30 Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA,
35 1981) enthalten. Als Kohlenstoffquelle können Zucker und

Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und gegebenenfalls Cellulose, Öle und Fette wie z.B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z.B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z.B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium-haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten, wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe z.B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff haltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur

eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 25°C bis 45°C und vorzugsweise bei 30°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum an L-Aminosäuren bzw. L-Threonin gebildet hat. Dieses Ziel wird
5 normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Die Analyse von L-Aminosäuren kann durch Anionenaustauschchromatographie mit anschließender Ninhydrin Derivatisierung erfolgen, so wie bei Spackman et
10 al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben, oder sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.

Eine Reinkultur des Escherichia coli K-12 Stammes
15 DH5 α /pMAK705 wurde am 12. September 2000 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapester Vertrag als DSM 13720 hinterlegt.

Eine Reinkultur des Escherichia coli K-12 Stammes
20 MG442 Δ pckA wurde am 02. Oktober 2000 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapester Vertrag als DSM 13761 hinterlegt.

Eine Reinkultur des Escherichia coli K-12 Stammes
25 B-3996kur Δ tdh Δ pckA/pVIC40 wurde am 09. März 2001 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapester Vertrag als DSM 14150 hinterlegt.

Eine Reinkultur des Escherichia coli K-12 Stammes
30 MG442 Δ 90yjfA wurde am 09. Mai 2001 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapester Vertrag als DSM 14289 hinterlegt.

Es ist erfindungsgemäß ebenfalls möglich, die Abschwächung der offenen Leserahmen ytfP und yjfA einzeln vorzunehmen, um zu einer verbesserten Herstellung von L-Aminosäuren zu gelangen.

- 5 Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, wie z. B. L-Threonin, L-Isoleucin, L-Methionin, L-Homoserin und L-Lysin, insbesondere L-Threonin.

Beispiele

Die vorliegende Erfindung wird im Folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* sowie
5 alle Techniken zur Restriktion, Klenow- und alkalische Phosphatasebehandlung wurden nach Sambrook et al.

(Molecular cloning - A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press) durchgeführt. Die Transformation von *Escherichia coli* wurde, wenn nicht anders beschrieben,
10 nach Chung et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA (1989) 86: 2172-2175) durchgeführt.

Die Bebrütungstemperatur bei der Herstellung von Stämmen und Transformanten war 37°C. Bei dem
15 Genaustauschverfahren nach Hamilton et.al. wurden Temperaturen von 30°C und 44°C verwendet.

Beispiel 1

Konstruktion der Deletionsmutation des pckA-Gens

20 Teile der 5'- und 3'-Region des pckA-Gens wurden aus *Escherichia coli* K12 unter Anwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) sowie synthetischen Oligonukleotiden amplifiziert. Ausgehend von der Nukletidsequenz des pckA-Gens in *E. coli* K12 MG1655 (SEQ ID No. 1) wurden folgende
25 PCR-Primer synthetisiert (MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland):

pckA'5'-1: 5' - GATCCGAGCCTGACAGGTTA - 3'

pckA'5'-2: 5' - GCATGCGCTCGGTCAGGTTA - 3'

pckA'3'-1: 5' - AGGCCTGAAGATGGCACTATCG - 3'

30 pckA'3'-2: 5' - CCGGAGAAGCGTAGGTGTTA - 3'

Die für die PCR eingesetzte chromosomale E. coli K12 MG1655 DNA wurde nach Herstellerangaben mit „Qiagen Genomic-tips 100/G“ (QIAGEN, Hilden, Deutschland) isoliert. Ein ca. 500 bp grosses DNA-Fragment aus der 5'-Region des pckA-Gens (mit pck1 bezeichnet) und ein ca. 600 bp grosses DNA-Fragment aus der 3'-Region des pckA-Gens (mit pck2 bezeichnet) konnte mit den spezifischen Primern unter Standard-PCR-Bedingungen (Innis et al. (1990) PCR Protocols. A guide to methods and applications, Academic Press) mit der Taq-DNA-Polymerase (Gibco-BRL, Eggenstein, Deutschland) amplifiziert werden. Die PCR-Produkte wurden den Herstellerangaben entsprechend jeweils mit dem Vektor pCR2.1TOPO (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen, Groningen, Niederlande) ligiert und in den E. coli Stamm TOP10F' transformiert. Die Selektion Plasmid tragender Zellen erfolgte auf LB Agar, der mit 50 µg/ml Ampicillin versetzt war. Nach der Plasmid DNA Isolierung wurde der Vektor pCR2.1TOPOpck2 mit den Restriktionsenzymen StuI und XbaI gespalten und das pck2-Fragment nach der Auftrennung im 0,8%igen Agarosegel mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Deutschland) isoliert. Der Vektor pCR2.1TOPOpck1 wurde nach der Plasmid DNA Isolierung mit den Enzymen EcoRV und XbaI gespalten und mit dem isolierten pck2-Fragment ligiert. Der E. coli Stamm DH5α wurde mit dem Ligationsansatz transformiert und Plasmid tragende Zellen auf LB Agar, der mit 50 µg/ml Ampicillin versetzt war, selektioniert. Nach der Plasmid DNA Isolierung wurden durch die Kontrollspaltung mit den Enzymen SpeI und XbaI solche Plasmide nachgewiesen, in denen die in SEQ ID No. 3 dargestellte mutagene DNA Sequenz kloniert vorliegt. Eines der Plasmide wurde als pCR2.1TOPOΔpckA bezeichnet.

Beispiel 2

Konstruktion des Austauschvektors pMAK705ΔpckA

Das in Beispiel 1 beschriebene pckA-Allel wurde aus dem Vektor pCR2.1TOPOΔpckA nach der Restriktion mit den Enzymen

SpeI und XbaI und Auftrennung im 0,8%igen Agarosegel isoliert und mit dem Plasmid pMAK705 (Hamilton et al. (1989) Journal of Bacteriology 174, 4617 - 4622), das mit dem Enzym XbaI verdaut worden war, ligiert. Der

5 Ligationsansatz wurde in DH5 α transformiert und Plasmid tragende Zellen auf LB Agar, der mit 20 μ g/ml Chloramphenicol versetzt war, selektioniert. Die erfolgreiche Klonierung wurde nach Plasmid DNA Isolierung und Spaltung mit den Enzymen HpaI, KpnI, HindIII, SalI und

10 PstI nachgewiesen. Der entstandene Austauschvektor pMAK705 Δ pckA (= pMAK705deltapckA) ist in Figur 1 dargestellt.

Beispiel 3

15 Ortsspezifische Mutagenese des pckA-Gens in dem E. coli Stamm MG442

Der L-Threonin produzierende E. coli Stamm MG442 ist in der Patentschrift US-A- 4,278,765 beschrieben und bei der Russischen Nationalsammlung für industrielle

20 Mikroorganismen (VKPM, Moskau, Russland) als CMIM B-1628 hinterlegt.

Der Stamm MG442 weist eine Resistenz gegen α -Amino- β -Hydroxyvaleriansäure auf und besitzt eine gegebenenfalls partielle und kompensierbare Bedürftigkeit für L-Isoleucin.

25 Für den Austausch des chromosomalen pckA-Gens gegen das Plasmid-kodierte Deletionskonstrukt wurde MG442 mit dem Plasmid pMAK705 Δ pckA transformiert. Der Genaustausch erfolgte mit dem von Hamilton et al. (1989) Journal of Bacteriology 174, 4617 - 4622) beschriebenen

30 Selektionsverfahren und wurde durch Standard-PCR-Methoden (Innis et al. (1990) PCR Protocols. A guide to methods and applications, Academic Press) mit folgenden Oligonukleotid Primern verifiziert:

pckA'5'-1: 5' - GATCCGAGCCTGACAGGTTA - 3'

pckA'3'-2: 5' - CCGGAGAAGCGTAGGTGTTA - 3'

Der erhaltene Stamm wurde als MG442 Δ pckA bezeichnet.

Beispiel 4

5 Herstellung von L-Threonin mit dem Stamm MG442 Δ pckA

- MG442 Δ pckA wurde auf Minimalmedium mit der folgenden Zusammensetzung vermehrt: 3,5 g/l Na₂HPO₄*2H₂O, 1,5 g/l KH₂PO₄, 1 g/l NH₄Cl, 0,1 g/l MgSO₄*7H₂O, 2 g/l Glucose, 20 g/l Agar. Die Bildung von L-Threonin wurde in batch
- 10 Kulturen von 10 ml, die in 100 ml Erlenmeierkolben enthalten waren, überprüft. Dazu wurde 10 ml Vorkulturmedium der folgenden Zusammensetzung: 2 g/l Hefeextrakt, 10 g/l (NH₄)₂SO₄, 1 g/l KH₂PO₄, 0,5 g/l MgSO₄*7H₂O, 15 g/l CaCO₃, 20 g/l Glucose beimpft und für 16
- 15 Stunden bei 37°C und 180 rpm auf einem ESR Inkubator der Firma Kühner AG (Birsfelden, Schweiz) inkubiert. 250 μ l dieser Vorkultur wurden in 10 ml Produktionsmedium (25 g/l (NH₄)₂SO₄, 2 g/l KH₂PO₄, 1 g/l MgSO₄*7H₂O, 0,03 g/l FeSO₄*7H₂O, 0,018 g/l MnSO₄*1H₂O, 30 g/l CaCO₃, 20 g/l
- 20 Glucose) überimpft und für 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die optische Dichte (OD) der Kultursuspension mit einem LP2W-Photometer der Firma Dr. Lange (Berlin, Deutschland) bei einer Messwellenlänge von 660 nm bestimmt.
- 25 Anschließend wurde die Konzentration an gebildetem L-Threonin im steril filtrierten Kulturüberstand mit einem Aminosäureanalysator der Firma Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Deutschland) durch Ionenaustauschchromatographie und Nachsäulenreaktion mit Ninhydrindetektion bestimmt.
- 30 In Tabelle 1 ist das Ergebnis des Versuches dargestellt.

Tabelle 1

Stamm	OD	L-Threonin g/l
MG442	6,0	1,5
MG442 Δ pckA	5,4	3,7

xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx ab hier 2. Innere Priorität xxxxxxxxxxxxxxx

Beispiel 5

Herstellung von L-Threonin mit dem Stamm

5 MG442 Δ pckA/pMW218gdhA

5.1 Amplifizierung und Klonierung des *gdhA*-Gens

Das Glutamat-Dehydrogenase-Gen aus *Escherichia coli* K12 wird unter Anwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) sowie synthetischen Oligonukleotiden amplifiziert.

- 10 Ausgehend von der Nukleotidsequenz für das *gdhA*-Gen in *E. coli* K12 MG1655 (GenBank: Accession Nr. AE000270 und Nr. AE000271) werden PCR-Primer synthetisiert (MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland):

Gdh1: 5' - TGAACACTTCTGGCGGTACG - 3'

- 15 Gdh2: 5' - CCTCGGCGAAGCTAATATGG - 3'

Die für die PCR eingesetzte chromosomale *E. coli* K12 MG1655 DNA wird nach Herstellerangaben mit „QIAGEN Genomic-tips 100/G“ (QIAGEN, Hilden, Deutschland) isoliert. Ein ca. 2150 bp großes DNA-Fragment, das den *gdhA*-Kodierbereich und ca.

- 20 350 bp 5'-flankierende und ca. 450 bp 3'-flankierende Sequenzen umfaßt, kann mit den spezifischen Primern unter Standard-PCR-Bedingungen (Innis et al.: PCR protocols. A guide to methods and applications, 1990, Academic Press) mit der Pfu-DNA Polymerase (Promega Corporation, Madison, USA) amplifiziert werden. Das PCR-Produkt wird in das Plasmid pCR2.1TOPO kloniert und in den *E. coli* Stamm TOP10 transformiert (Invitrogen, Leek, Niederlande,

Produktbeschreibung TOPO TA Cloning Kit, Cat. No. K4500-01). Die erfolgreiche Klonierung wird durch Spaltung des Plasmids pCR2.1TOPOgdhA mit den Restriktionsenzymen EcoRI und EcoRV nachgewiesen. Dazu wird die Plasmid DNA mittels
5 des „QIAprep Spin Plasmid Kits“ (QIAGEN, Hilden, Deutschland) isoliert und nach der Spaltung in einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt.

5.2 Klonierung des gdhA-Gens in den Plasmidvektor pMW218

Das Plasmid pCR2.1TOPOgdhA wird mit dem Enzym EcoRI
10 gespalten, der Spaltungsansatz im 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt und das 2,1 kbp große gdhA-Fragment mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction Kit“ (QIAGEN, Hilden, Deutschland) isoliert. Das Plasmid pMW218 (Nippon Gene, Toyama, Japan) wird mit dem Enzym EcoRI gespalten und mit
15 dem gdhA-Fragment ligiert. Der E. coli Stamm DH5 α wird mit dem Ligationsansatz transformiert und pMW218 tragende Zellen durch Ausplattieren auf LB Agar (Lennox, Virology 1955, 1: 190), der mit 20 μ g/ml Kanamycin versetzt ist, selektioniert.

20 Die erfolgreiche Klonierung des gdhA-Gens kann nach der Plasmid DNA-Isolierung und Kontrollspaltung mit EcoRI und EcoRV nachgewiesen werden. Das Plasmid wird als pMW218gdhA (Figur 3) bezeichnet.

5.3 Herstellung des Stammes MG442 Δ pckA/pMW218gdhA

25 Der in Beispiel 3 erhaltene Stamm MG442 Δ pckA und der Stamm MG442 werden mit dem Plasmid pMW218gdhA transformiert und Transformanten auf LB-Agar selektioniert, der mit 20 μ g/ml Kanamycin supplementiert ist. Auf diese Weise entstehen die Stämme MG442 Δ pckA/pMW218gdhA und MG442/pMW218gdhA.

30 5.4 Herstellung von L-Threonin

Die Herstellung von L-Threonin durch die Stämme MG442 Δ pckA/pMW218gdhA und MG442/pMW218gdhA wird wie in Beispiel 4 beschrieben geprüft. Das Minimalmedium und das

Vorkulturmedium werden zusätzlich mit 20 µg/ml Kanamycin supplementiert.

In Tabelle 2 ist das Ergebnis des Versuches zusammengefasst.

5

Tabelle 2

Stamm	OD (660 nm)	L-Threonin g/l
MG442	6,0	1,5
MG442ΔpckA	5,4	3,7
MG442/pMW218gdhA	5,6	2,6
MG442ΔpckA/pMW218gdhA	5,5	4,0

Beispiel 6

Herstellung von L-Threonin mit dem Stamm
MG442ΔpckA/pMW219rhtC

10 6.1 Amplifizierung des rhtC-Gens

Das rhtC-Gen aus *Escherichia coli* K12 wird unter Anwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) sowie synthetischen Oligonukleotiden amplifiziert. Ausgehend von der Nukleotidsequenz für das rhtC-Gen in *E. coli* K12 MG1655

- 15 (GenBank: Accession Nr. AE000458, Zakataeva et al. (FEBS Letters 452, 228-232 (1999)) werden PCR-Primer synthetisiert (MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland):

RhtC1: 5' - CTGTTAGCATCGGCGAGGCA - 3'

RhtC2: 5' - GCATGTTGATGGCGATGACG - 3'

- 20 Die für die PCR eingesetzte chromosomale *E. coli* K12 MG1655 DNA wird nach Herstellerangaben mit „QIAGEN Genomic-tips 100/G“ (QIAGEN, Hilden, Deutschland) isoliert. Ein ca. 800

bp großes DNA-Fragment kann mit den spezifischen Primern unter Standard-PCR-Bedingungen (Innis et al.: PCR protocols. A guide to methods and applications, 1990, Academic Press) mit der Pfu-DNA Polymerase (Promega Corporation, Madison, USA) amplifiziert werden.

6.2 Klonierung des rhtC-Gens in den Plasmidvektor pMW219

Das Plasmid pMW219 (Nippon Gene, Toyama, Japan) wird mit dem Enzym SmaI gespalten und mit dem rhtC-PCR-Fragment ligiert. Der E. coli Stamm DH5 α wird mit dem

10 Ligationsansatz transformiert und pMW219 tragende Zellen auf LB Agar, der mit 20 μ g/ml Kanamycin supplementiert ist, selektioniert. Die erfolgreiche Klonierung kann nach der Plasmid DNA-Isolierung und Kontrollspaltung mit KpnI, HindIII und NcoI nachgewiesen werden. Das Plasmid

15 pMW219rhtC ist in Figur 4 dargestellt.

6.3 Herstellung des Stammes MG442 Δ pckA/pMW219rhtC

Der in Beispiel 3 erhaltene Stamm MG442 Δ pckA und der Stamm MG442 werden mit dem Plasmid pMW219rhtC transformiert und Transformanten auf LB-Agar selektioniert, der mit 20 μ g/ml

20 Kanamycin supplementiert ist. Auf diese Weise entstehen die Stämme MG442 Δ pckA/pMW219rhtC und MG442/pMW219rhtC.

6.4 Herstellung von L-Threonin

Die Herstellung von L-Threonin durch die Stämme MG442 Δ pckA/pMW219rhtC und MG442/pMW219rhtC wird wie in

25 Beispiel 4 beschrieben geprüft. Das Minimalmedium und das Vorkulturmedium werden zusätzlich mit 20 μ g/ml Kanamycin supplementiert.

In Tabelle 3 ist das Ergebnis des Versuches zusammengefasst.

30

Tabelle 3

Stamm	OD (660 nm)	L-Threonin g/l
MG442	6,0	1,5
MG442 Δ pckA	5,4	3,7
MG442/pMW219rhtC	5,2	2,9
MG442 Δ pckA/pMW219rhtC	4,8	4,4

Beispiel 7

Herstellung von L-Threonin mit dem Stamm B-3996kur Δ tdh Δ pckA/pVIC40

- 5 Der L-Threonin produzierende E. coli Stamm B-3996 ist in US-A- 5,175,107 beschrieben und bei der Russischen Nationalsammlung für industrielle Mikroorganismen (VKPM, Moskau, Russland) hinterlegt.

- 10 Der Stamm B-3996 weist unter anderem eine Resistenz gegen α -Amino- β -Hydroxyvaleriansäure auf, besitzt eine abgeschwächte, insbesondere ausgeschaltete, beziehungsweise defekte Threonindehydrogenase, besitzt eine verstärkte Homoserin-Dehydrogenase I-Aspartatkinase I in der feed back resistenten Form, besitzt eine gegebenenfalls partielle und
- 15 kompensierbare Bedürftigkeit für L-Isoleucin und besitzt die Fähigkeit zur Saccharose-Verwertung.

7.1 Herstellung des Stammes B-3996kur Δ tdh Δ pckA/pVIC40

- Von Stamm B-3996 wird nach Kultur im Antibiotika-freien Vollmedium für ungefähr zehn Generationen ein Derivat
- 20 isoliert, das das Plasmid pVIC40 nicht mehr enthält. Der entstandene Stamm ist Streptomycin-sensitiv und wird als B-3996kur bezeichnet.

Zum Einbau einer Deletion in das tdh-Gen wird die von Hamilton et al. (Journal of Bacteriology (1989) 171: 4617-

4622) beschriebene Methode eingesetzt, die auf der Verwendung des Plasmids pMAK705 mit einem temperatursensitiven Replikon beruht. Das Plasmid pDR121 (Ravnikar und Somerville, Journal of Bacteriology (1987) 169:4716-4721) enthält ein 3,7 Kilo-Basenpaare (kbp) großes DNA-Fragment aus E. coli, auf dem das tdh-Gen kodiert ist. Zur Erzeugung einer Deletion des tdh-Genbereiches wird pDR121 mit den Restriktionsenzymen ClaI und EcoRV gespalten und das isolierte 5 kbp große DNA-Fragment nach Behandlung mit dem Klenow-Enzym ligiert. Der Ligationsansatz wird in den E. coli Stamm DH5 α transformiert und Plasmid tragende Zellen auf LB Agar, der mit 50 μ g/ml Ampicillin versetzt ist, selektioniert.

Die erfolgreiche Deletion des tdh-Gens kann nach der Plasmid-DNA Isolierung und Kontrollspaltung mit EcoRI nachgewiesen werden. Das 1,7 kbp große EcoRI-Fragment wird isoliert und mit dem Plasmid pMAK705, das partiell mit EcoRI verdaut wird, ligiert. Der Ligationsansatz wird in DH5 α transformiert und Plasmid tragende Zellen auf LB Agar, der mit 20 μ g/ml Chloramphenicol versetzt ist, selektioniert. Die erfolgreiche Klonierung wird nach Plasmid-DNA Isolierung und Spaltung mit EcoRI nachgewiesen. Das entstandene pMAK705 Derivat wird als pDM32 bezeichnet.

Für den Genaustausch wird B-3996kur mit dem Plasmid pDM32 transformiert. Der Austausch des chromosomalen tdh-Gens gegen das Plasmid-kodierte Deletionskonstrukt erfolgt mit dem von Hamilton et al. beschriebenen Selektionsverfahren und wird durch Standard-PCR-Methoden (Innis et al. (1990), PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press) mit folgenden Oligonukleotid Primern verifiziert:

Tdh1: 5'-TCGCGACCTATAAGTTTGGG-3'

Tdh2: 5'-AATACCAGCCCTTGTTCGTG-3'.

Der entstandene Stamm wird auf Kanamycin-Sensitivität getestet und als B-3996kur Δ tdh bezeichnet.

Für die ortsspezifische Mutagenese des pckA-Gens wird B-3996kurΔtdh mit dem in Beispiel 2 beschriebenen Austauschvektor pMAK705ΔpckA transformiert. Der Austausch des chromosomalen pckA-Gens gegen das Plasmid-kodierte
 5 Deletionskonstrukt erfolgt wie in Beispiel 3 beschrieben. Der erhaltene Stamm wird als B-3996kurΔtdhΔpckA bezeichnet.

B-3996kurΔtdh und B-3996kurΔtdhΔpckA werden mit dem aus B-3996 isolierten Plasmid pVIC40 transformiert und auf LB-Agar mit 20 µg/ml Streptomycin Plasmid tragende Zellen
 10 selektioniert. Jeweils eine ausgewählte Einzelkolonie wird mit B-3996kurΔtdh/pVIC40 und mit B-3996kurΔtdhΔpckA/pVIC40 bezeichnet.

7.2 Herstellung von L-Threonin

Die Herstellung von L-Threonin durch die Stämme
 15 B-3996kurΔtdh/pVIC40 und B-3996kurΔtdhΔpckA/pVIC40 wird wie im Beispiel 4 beschrieben geprüft. Das Minimalmedium, das Vorkulturmedium und das Produktionsmedium werden zusätzlich mit 20 µg/ml Streptomycin supplementiert.

In Tabelle 4 ist das Ergebnis des Versuches
 20 zusammengefasst.

Tabelle 4

Stamm	OD (660)	L-Threonin g/l
B-3996kurΔtdh/pVIC40	4,7	6,26
B-3996kurΔtdhΔpckA/pVIC40	4,9	8,92

Beispiel 8

25 Herstellung von L-Lysin mit dem Stamm TOC21RΔpckA

Der L-Lysin produzierende E. coli Stamm pDA1/TOC21R ist in der Patentanmeldung F-A-2511032 beschrieben und bei der Collection Nationale de Culture de Microorganisme (CNCM, Institut Pasteur, Paris, Frankreich) unter der Nummer I-167
5 hinterlegt. Der Stamm und der plasmidfreie Wirt sind ebenfalls bei Dauce-Le Reverend et al. (European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology 15:227-231 (1982)) unter der Bezeichnung TOC21R/pDA1 beschrieben.

8.1 Ortsspezifische Mutagenese des pckA-Gens in dem E. coli 10 Stamm TOC21R

Von Stamm pDA1/TOC21R wird nach Kultur im Antibiotika-freien LB-Medium für ungefähr sechs Generationen ein Derivat isoliert, das das Plasmid pDA1 nicht mehr enthält. Der entstandene Stamm ist Tetracyclin-sensitiv und wird als
15 TOC21R bezeichnet.

Für den Austausch des chromosomalen pckA-Gens gegen das Plasmid-kodierte Deletionskonstrukt wird TOC21R mit dem Plasmid pMAK705ΔpckA (Beispiel 2) transformiert. Der Genaustausch erfolgt mit dem von Hamilton et al. (1989)
20 Journal of Bacteriology 174, 4617 - 4622) beschriebenen Selektionsverfahren und wird durch Standard-PCR-Methoden (Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press) mit folgenden Oligonukleotid Primern verifiziert:

25 pckA'5'-1: 5' - GATCCGAGCCTGACAGGTTA - 3'

pckA'3'-2: 5' - CCGGAGAAGCGTAGGTGTTA - 3'

Der erhaltene Stamm wird als TOC21RΔpckA bezeichnet.

8.2 Herstellung von L-Lysin mit dem Stamm TOC21RΔpckA

Die Bildung von L-Lysin durch die Stämme TOC21RΔ pckA und
30 TOC21R wird in batch Kulturen von 10 ml, die in 100 ml Erlenmeierkolben enthalten sind, überprüft. Dazu wird 10 ml Vorkulturmedium der folgenden Zusammensetzung: 2 g/l Hefeextrakt, 10 g/l (NH₄)₂SO₄, 1 g/l KH₂PO₄, 0,5 g/l

MgSO₄*7H₂O, 15 g/l CaCO₃, 20 g/l Glucose beimpft und für 16 Stunden bei 37°C und 180 rpm auf einem ESR Inkubator der Firma Kühner AG (Birsfelden, Schweiz) inkubiert. 250 µl dieser Vorkultur werden in 10 ml Produktionsmedium (25 g/l (NH₄)₂SO₄, 2 g/l KH₂PO₄, 1 g/l MgSO₄*7H₂O, 0,03 g/l FeSO₄*7H₂O, 0,018 g/l MnSO₄*1H₂O, 30 g/l CaCO₃, 20 g/l Glucose, 25 mg/l L-Isoleucin und 5 mg/l Thiamin) überimpft und für 72 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wird die optische Dichte (OD) der Kultursuspension mit einem LP2W-Photometer der Firma Dr. Lange (Berlin, Deutschland) bei einer Messwellenlänge von 660 nm bestimmt.

Anschließend wird die Konzentration an gebildetem L-Lysin im steril filtrierten Kulturüberstand mit einem Aminosäureanalysator der Firma Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Deutschland) durch Ionenaustauschchromatographie und Nachsäulenreaktion mit Ninhydrindetektion bestimmt.

In Tabelle 5 ist das Ergebnis des Versuches dargestellt.

Tabelle 5

Stamm	OD (660 nm)	L-Lysin g/l
TOC21R	1,0	1,14
TOC21RΔpckA	1,0	1,27

20 Beispiel 9

Herstellung von L-Isoleucin mit dem Stamm Stamm
B-3996kurΔtdhilvA⁺ΔpckA/pVIC40

9.1 Herstellung des Stammes B-3996kurΔtdhilvA⁺ΔpckA/pVIC40

Der in Beispiel 7.1 erhaltene L-Isoleucin bedürftige Stamm B-3996kurΔtdh wird unter Zuhilfenahme des Phagen Plkc (Lennox, Virology 1, 190-206 (1955); Miller, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbour Laboratory 1972)

transduziert und L-Isoleucin prototrophe Transduktanten isoliert.

Hierzu wird der Phage Plkc auf dem Stamm MG1655 (Guyer et al., Cold Spring Harbor Symposium of Quantitative Biology 5 45, 135-140 (1981) und Blattner et al., Science 277, 1453-1462 (1997)) vermehrt und das Phagenlysate zur Transduktion des Stammes B-3996kur Δ tdh eingesetzt. Die Multiplizität der Infektion beträgt ungefähr 0,2. Die Selektion auf L-Isoleucin prototrophe Transduktanten erfolgt auf Minimal- 10 Agar, der 2 g/l Glucose und 10 mg/l L-Threonin enthält. Eine L-Isoleucin prototrophe Transduktante wird isoliert, zur Reinigung beziehungsweise Vereinzelung auf LB-Agar ausgestrichen und als B-3996kur Δ tdhilvA⁺ bezeichnet.

Das pckA-Gen des Stammes B-3996kur Δ tdhilvA⁺ wird 15 anschliessend gegen das in Beispiel 1 und 2 hergestellte Δ pckA-Allel so wie in Beispiel 3 beschrieben ausgetauscht. Der erhaltene Stamm wird als B-3996kur Δ tdhilvA⁺ Δ pckA bezeichnet.

Die Stämme B-3996kur Δ tdhilvA⁺ und B-3996kur Δ tdhilvA⁺ Δ pckA 20 werden mit dem aus Stamm B-3996 isolierten Plasmid pVIC40 transformiert und Plasmid tragende Zellen auf LB-Agar, der mit 20 μ g/ml Streptomycin supplementiert ist, selektioniert. Jeweils eine ausgewählte Einzelkolonie wird als B-3996kur Δ tdhilvA⁺ Δ pckA/pVIC40 und B- 25 3996kur Δ tdhilvA⁺/pVIC40 bezeichnet.

9.2 Herstellung von L-Isoleucin

Die Herstellung von L-Isoleucin durch die Stämme B-3996kur Δ tdhilvA⁺/pVIC40 und B-3996kur Δ tdhilvA⁺ Δ pckA/pVIC40 wird unter den Versuchsbedingungen, wie in Beispiel 4 30 beschrieben, geprüft. Das Minimalmedium, das Vorkulturmedium und das Produktionsmedium werden zusätzlich mit 20 μ g/ml Streptomycin supplementiert.

In Tabelle 6 ist das Ergebnis des Versuches dargestellt.

Tabelle 6

Stamm	OD (660)	L-Isoleucin mg/l
B-3996kur Δ tdhilvA ⁺ /pVIC40	5,8	57
B-3996kur Δ tdhilvA ⁺ Δ pckA/pVIC40	5,7	70

Beispiel 10

Herstellung von L-Valin mit dem Stamm B-12288 Δ pckA

Der L-Valin produzierende E. coli Stamm AJ 11502 ist in der Patentschrift US-A-4391907 beschrieben und bei dem National Center for Agricultural Utilization Research (Peoria, Illinois, USA) als NRRL B-12288 hinterlegt.

10.1 Ortsspezifische Mutagenese des pckA-Gens in dem E. coli Stamm B-1288

10 Von Stamm AJ 11502 wird nach Kultur im Antibiotika-freien LB-Medium für ungefähr sechs Generationen ein plasmidfreies Derivat isoliert. Der entstandene Stamm ist Ampicillin-sensitiv und wird als AJ11502kur bezeichnet.

Für den Austausch des chromosomalen pckA-Gens gegen das Plasmid-kodierte Deletionskonstrukt wird AJ11502kur mit dem Plasmid pMAK705 Δ pckA (Siehe Beispiel 2) transformiert. Der Genaustausch erfolgt mit dem von Hamilton et al. (1989) Journal of Bacteriology 174, 4617 - 4622) beschriebenen Selektionsverfahren und wird durch Standard-PCR-Methoden (Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press) mit folgenden Oligonukleotid Primern verifiziert:

pckA'5'-1: 5' - GATCCGAGCCTGACAGGTTA - 3'

pckA'3'-2: 5' - CCGGAGAAGCGTAGGTGTTA - 3'

25 Der erhaltene Stamm wird als AJ11502kur Δ pckA bezeichnet. Aus Stamm NRRL B-12288 wird das in der Patentschrift US-A-

4391907 beschriebene Plasmid isoliert, welches die genetische Information bezüglich der Valin-Produktion trägt. Der Stamm AJ11502kur Δ pckA wird mit diesem Plasmid transformiert. Eine der erhaltenen Transformanten wird als
5 B-12288 Δ pckA bezeichnet.

10.2 Herstellung von L-Valin mit dem Stamm B-12288 Δ pckA

Die Bildung von L-Valin durch die Stämme B-12288 Δ pckA und NRRL B-12288 wird in batch Kulturen von 10 ml, die in 100 ml Erlenmeierkolben enthalten sind, überprüft. Dazu wird 10
10 ml Vorkulturmedium der folgenden Zusammensetzung: 2 g/l Hefeextrakt, 10 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g/l KH_2PO_4 , 0,5 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15 g/l CaCO_3 , 20 g/l Glucose und 50 mg/l Ampicillin beimpft und für 16 Stunden bei 37°C und 180 rpm auf einem ESR Inkubator der Firma Kühner AG (Birsfelden,
15 Schweiz) inkubiert. 250 μ l dieser Vorkultur werden in 10 ml Produktionsmedium (25 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 g/l KH_2PO_4 , 1 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,03 g/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,018 g/l $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 30 g/l CaCO_3 , 20 g/l Glucose, 5 mg/l Thiamin und 50 mg/l Ampicillin) überimpft und für 72 Stunden bei 37°C
20 inkubiert. Nach der Inkubation wird die optische Dichte (OD) der Kultursuspension mit einem LP2W-Photometer der Firma Dr. Lange (Berlin, Deutschland) bei einer Messwellenlänge von 660 nm bestimmt.

Anschließend wird die Konzentration an gebildetem L-Valin
25 im steril filtrierten Kulturüberstand mit einem Aminosäureanalysator der Firma Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Deutschland) durch Ionenaustauschchromatographie und Nachsäulenreaktion mit Ninhydrindetektion bestimmt.

In Tabelle 7 ist das Ergebnis des Versuches dargestellt.

30

Tabelle 7

Stamm	OD (660 nm)	L-Valin g/l
NRRL B-12288	5,6	0,93

B-12288ΔpckA	5,5	1,12
--------------	-----	------

Beispiel 11

Konstruktion von Deletionsmutationen der ytfP-yjfa Genregion

- 5 Die ytfP-yjfa Genregion wird aus Escherichia coli K12 unter Anwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) sowie synthetischen Oligonukleotiden amplifiziert. Ausgehend von der Nukleotidsequenz der ytfP-yjfa Genregion in E. coli K12 MG1655 (SEQ ID No. 5) werden folgende PCR-Primer
- 10 synthetisiert (MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland):

ytfP-1: 5' - GGCGATGTCGCAACAAGCTG - 3'

ytfP-2: 5' - CTGTTTCATGGCCGCTTGCTG - 3'

- Die für die PCR eingesetzte chromosomale E. coli K12 MG1655 DNA wird nach Herstellerangaben mit „Qiagen Genomic-tips
- 15 100/G“ (QIAGEN, Hilden, Deutschland) isoliert. Ein ca. 1300 bp grosses DNA-Fragment kann mit den spezifischen Primern unter Standard-PCR-Bedingungen (Innis et al. (1990) PCR Protocols. A guide to methods and applications, Academic Press) mit der Taq-DNA-Polymerase (Gibco-BRL, Eggenstein,
- 20 Deutschland) amplifiziert werden. Das PCR-Produkt wird den Herstellerangaben entsprechend mit dem Vektor pCR2.1TOPO (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen, Groningen, Niederlande) ligiert und in den E. coli Stamm TOP10F' transformiert. Die Selektion Plasmid tragender Zellen erfolgt auf LB Agar, der
- 25 mit 50 µg/ml Ampicillin versetzt ist. Nach der Plasmid DNA Isolierung wird die erfolgreiche Klonierung des PCR-Produktes mit den Restriktionsenzymen EcoRI und NsiI überprüft.

- Zur Erzeugung einer 337 bp Deletion in der ytfP-yjfa Region
- 30 wird der Vektor pCR2.1TOPOytfP-yjfa mit den Restriktionsenzymen NdeI und SspI gespalten und das 4,8 kbp

große DNA-Fragment nach Behandlung mit dem Klenow-Enzym ligiert.

Zur Erzeugung einer 90 bp Deletion wird der Vektor pCR2.1TOPOytfP-yjfa mit den Enzymen NdeI und SplI gespalten
5 und das 5 kbp große DNA-Fragment nach Behandlung mit dem Klenow-Enzym ligiert.

Der E. coli Stamm DH5 α wird mit den Ligationsansätzen transformiert und Plasmid tragende Zellen auf LB Agar, der mit 50 μ g/ml Ampicillin versetzt ist, selektioniert. Nach
10 der Plasmid DNA Isolierung werden durch die Kontrollspaltung mit den Enzym EcoRI solche Plasmide nachgewiesen, in denen die in SEQ ID No. 6 und die in SEQ ID No. 7 dargestellte mutagene DNA Sequenz kloniert vorliegt. Die Plasmide werden als pCR2.1TOPO Δ yjfa und
15 pCR2.1TOPO Δ 90bp bezeichnet.

Beispiel 12

Konstruktion der Austauschvektoren pMAK705 Δ yjfa und pMAK705 Δ 90bp

20 Die in Beispiel 11 beschriebenen ytfP-yjfa Allele werden aus den Vektoren pCR2.1TOPO Δ yjfa und pCR2.1TOPO Δ 90bp nach der Restriktion mit den Enzymen SacI und XbaI und Auftrennung im 0,8%igen Agarosegel isoliert und mit dem Plasmid pMAK705 (Hamilton et al. (1989) Journal of
25 Bacteriology 174, 4617 - 4622), das mit den Enzymen SacI und XbaI verdaut wird, ligiert. Die Ligationsansätze werden in DH5 α transformiert und Plasmid tragende Zellen auf LB Agar, der mit 20 μ g/ml Chloramphenicol versetzt ist, selektioniert. Die erfolgreiche Klonierung wird nach
30 Plasmid DNA Isolierung und Spaltung mit den Enzymen SacI und XbaI nachgewiesen. Die entstandenen Austauschvektoren pMAK705 Δ yjfa (= pMAK705 Δ yjfa) und pMAK705 Δ 90bp (= pMAK705 Δ 90bp) sind in Figur 2 und in Figur 5 dargestellt.

Beispiel 13

Ortsspezifische Mutagenese der ytfP-yjfa Genregion in dem E. coli Stamm MG442

- 5 Für den Austausch der chromosomalen ytfP-yjfa Genregion gegen das Plasmid-kodierte 90 bp Deletionskonstrukt wird MG442 mit dem Plasmid pMAK705Δ90bp transformiert. Der Genaustausch erfolgt mit dem von Hamilton et al. (1989) Journal of Bacteriology 174, 4617 - 4622) beschriebenen
- 10 Selektionsverfahren und wird durch Standard-PCR-Methoden (Innis et al. (1990) PCR Protocols. A guide to methods and applications, Academic Press) mit folgenden Oligonukleotid Primern verifiziert:

ytfP-1: 5' - GGCGATGTCGCAACAAGCTG - 3'

- 15 ytfP-2: 5' - CTGTTTCATGGCCGCTTGCTG - 3'

Der erhaltene Stamm wird als MG442Δ90yjfa bezeichnet.

Beispiel 14

Herstellung von L-Threonin mit dem Stamm MG442Δ90yjfa

- 20 Die Herstellung von L-Threonin durch den Stamm MG442Δ90yjfa wird wie in Beispiel 4 beschrieben geprüft. In Tabelle 8 ist das Ergebnis des Versuches zusammengefasst.

Tabelle 8

Stamm	OD (660 nm)	L-Threonin g/l
MG442	6,0	1,5

MG442Δ90yjfA	5,7	2,1
--------------	-----	-----

Beispiel 14

Herstellung von L-Threonin mit dem Stamm MG442Δ90yjfAΔpckA

14.1 Herstellung des Stammes MG442Δ90yjfAΔpckA

- 5 Das pckA-Gen des Stammes MG442Δ90yjfA wird wie in Beispiel 3 beschrieben gegen das ΔpckA-Allel (Siehe Beispiel 1 und 2) ausgetauscht. Der erhaltene Stamm wird als MG442Δ90yjfAΔpckA bezeichnet.

14.2 Herstellung von L-Threonin

- 10 Die Herstellung von L-Threonin mit dem Stamm MG442Δ90yjfAΔpckA erfolgt wie in Beispiel 4 beschrieben. Das Ergebnis ist in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9

Stamm	OD (660 nm)	L-Threonin g/l
MG442Δ90yjfA	5,7	2,1
MG442Δ90yjfAΔpckA	5,3	3,9

Folgende Figuren sind beigelegt:

- Figur 1: pMAK705 Δ pckA (= pMAK705 Δ pckA)
- Figur 2: pMAK705 Δ yjfa (= pMAK705 Δ yjfa)
- Figur 3: pMW218gdhA
- 5 • Figur 4: pMW219rhtC
- Figur 5: pMAK705 Δ 90bp (= pMAK705 Δ 90bp)

Längenangaben sind als ca.-Angaben aufzufassen. Die verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen haben folgende Bedeutung:

- 10 • cat: Chloramphenicolresistenzgen
- rep-ts: temperatursensitive Replikationsregion des Plasmides pSC101
- pck1: Teil der 5'-Region des pckA-Gens
- pck2: Teil der 3'-Region des pckA-Gens
- 15 • ytfP'-yjfa': DNA-Sequenz enthaltend trunkeierte Kodierregionen von ytfP und yjfa
- kan: Kanamycinresistenzgen
- gdhA: Glutamat-Dehydrogenase-Gen
- rhtC: Threoninresistenz vermittelndes Gen

20

Die Abkürzungen für die Restriktionsenzyme haben folgende Bedeutung

- BamHI: Restriktionsendonuklease aus *Bacillus amyloliquefaciens*
- 25 • BglII: Restriktionsendonuklease aus *Bacillus globigii*
- ClaI: Restriktionsendonuklease aus *Caryophanon latum*

- EcoRI: Restriktionsendonuklease aus *Escherichia coli*
- EcoRV: Restriktionsendonuklease aus *Escherichia coli*
- HindIII: Restriktionsendonuklease aus *Haemophilus influenzae*
- 5 • KpnI: Restriktionsendonuklease aus *Klebsiella pneumoniae*
- PstI: Restriktionsendonuklease aus *Providencia stuartii*
- PvuI: Restriktionsendonuklease aus *Proteus vulgaris*
- 10 • SacI: Restriktionsendonuklease aus *Streptomyces achromogenes*
- SalI: Restriktionsendonuklease aus *Streptomyces albus*
- SmaI: Restriktionsendonuklease aus *Serratia marcescens*
- 15 • XbaI: Restriktionsendonuklease aus *Xanthomonas badrii*
- XhoI: Restriktionsendonuklease aus *Xanthomonas holcicola*

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa AG

5 <120> Verfahren zur fermentativen Herstellung von
L-Aminosäuren unter Verwendung von Stämmen der Familie
Enterobacteriaceae.

10 <130> 000425 BT

<140>

<141>

15 <160> 19

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1622

20 <212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

25 <222> (1)..(1620)

<223> pckA

<400> 1

30 atg cgc gtt aac aat ggt ttg acc ccg caa gaa ctc gag gct tat ggt 48
Met Arg Val Asn Asn Gly Leu Thr Pro Gln Glu Leu Glu Ala Tyr Gly
1 5 10 15

35 atc agt gac gta cat gat atc gtt tac aac cca agc tac gac ctg ctg 96
Ile Ser Asp Val His Asp Ile Val Tyr Asn Pro Ser Tyr Asp Leu Leu
20 25 30

40 tat cag gaa gag ctc gat ccg agc ctg aca ggt tat gag cgc ggg gtg 144
Tyr Gln Glu Glu Leu Asp Pro Ser Leu Thr Gly Tyr Glu Arg Gly Val
35 40 45

45 tta act aat ctg ggt gcc gtt gcc gtc gat acc ggg atc ttc acc ggt 192
Leu Thr Asn Leu Gly Ala Val Ala Val Asp Thr Gly Ile Phe Thr Gly
50 55 60

45 cgt tca cca aaa gat aag tat atc gtc cgt gac gat acc act cgc gat 240
Arg Ser Pro Lys Asp Lys Tyr Ile Val Arg Asp Asp Thr Thr Arg Asp
65 70 75 80

50 act ttc tgg tgg gca gac aaa ggc aaa ggt aag aac gac aac aaa cct 288
Thr Phe Trp Trp Ala Asp Lys Gly Lys Gly Lys Asn Asp Asn Lys Pro
85 90 95

55 ctc tct ccg gaa acc tgg cag cat ctg aaa ggc ctg gtg acc agg cag 336
Leu Ser Pro Glu Thr Trp Gln His Leu Lys Gly Leu Val Thr Arg Gln
100 105 110

60 ctt tcc ggc aaa cgt ctg ttc gtt gtc gac gct ttc tgt ggt gcg aac 384
Leu Ser Gly Lys Arg Leu Phe Val Val Asp Ala Phe Cys Gly Ala Asn
115 120 125

60 ccg gat act cgt ctt tcc gtc cgt ttc atc acc gaa gtg gcc tgg cag 432
Pro Asp Thr Arg Leu Ser Val Arg Phe Ile Thr Glu Val Ala Trp Gln
130 135 140

65 gcg cat ttt gtc aaa aac atg ttt att cgc ccg agc gat gaa gaa ctg 480
Ala His Phe Val Lys Asn Met Phe Ile Arg Pro Ser Asp Glu Glu Leu

	145		150		155		160	
5	gca ggt ttc aaa cca gac ttt atc gtt atg aac ggc gcg aag tgc act Ala Gly Phe Lys Pro Asp Phe Ile Val Met Asn Gly Ala Lys Cys Thr	528						
			165		170		175	
10	aac ccg cag tgg aaa gaa cag ggt ctc aac tcc gaa aac ttc gtg gcg Asn Pro Gln Trp Lys Glu Gln Gly Leu Asn Ser Glu Asn Phe Val Ala	576						
			180		185		190	
15	ttt aac ctg acc gag cgc atg cag ctg att ggc ggc acc tgg tac ggc Phe Asn Leu Thr Glu Arg Met Gln Leu Ile Gly Gly Thr Trp Tyr Gly	624						
			195		200		205	
20	ggc gaa atg aag aaa ggg atg ttc tcg atg atg aac tac ctg ctg ccg Gly Glu Met Lys Lys Gly Met Phe Ser Met Met Asn Tyr Leu Leu Pro	672						
			210		215		220	
25	ctg aaa ggt atc gct tct atg cac tgc tcc gcc aac gtt ggt gag aaa Leu Lys Gly Ile Ala Ser Met His Cys Ser Ala Asn Val Gly Glu Lys	720						
			225		230		235	
30	ggc gat gtt gcg gtg ttc ttc ggc ctt tcc ggc acc ggt aaa acc acc Gly Asp Val Ala Val Phe Phe Gly Leu Ser Gly Thr Gly Lys Thr Thr	768						
			245		250		255	
35	ctt tcc acc gac ccg aaa cgt cgc ctg att ggc gat gac gaa cac ggc Leu Ser Thr Asp Pro Lys Arg Arg Leu Ile Gly Asp Asp Glu His Gly	816						
			260		265		270	
40	tgg gac gat gac ggc gtg ttt aac ttc gaa ggc ggc tgc tac gca aaa Trp Asp Asp Asp Gly Val Phe Asn Phe Glu Gly Gly Cys Tyr Ala Lys	864						
			275		280		285	
45	act atc aag ctg tcg aaa gaa gcg gaa cct gaa atc tac aac gct atc Thr Ile Lys Leu Ser Lys Glu Ala Glu Pro Glu Ile Tyr Asn Ala Ile	912						
			290		295		300	
50	cgt cgt gat gcg ttg ctg gaa aac gtc acc gtg cgt gaa gat ggc act Arg Arg Asp Ala Leu Glu Asn Val Thr Val Arg Glu Asp Gly Thr	960						
			305		310		315	
55	atc gac ttt gat gat ggt tca aaa acc gag aac acc cgc gtt tct tat Ile Asp Phe Asp Asp Gly Ser Lys Thr Glu Asn Thr Arg Val Ser Tyr	1008						
			325		330		335	
60	ccg atc tat cac atc gat aac att gtt aag ccg gtt tcc aaa gcg ggc Pro Ile Tyr His Ile Asp Asn Ile Val Lys Pro Val Ser Lys Ala Gly	1056						
			340		345		350	
65	cac gcg act aag gtt atc ttc ctg act gct gat gct ttc ggc gtg ttg His Ala Thr Lys Val Ile Phe Leu Thr Ala Asp Ala Phe Gly Val Leu	1104						
			355		360		365	
70	ccg ccg gtt tct cgc ctg act gcc gat caa acc cag tat cac ttc ctc Pro Pro Val Ser Arg Leu Thr Ala Asp Gln Thr Gln Tyr His Phe Leu	1152						
			370		375		380	
75	tct ggc ttc acc gcc aaa ctg gcc ggt act gag cgt ggc atc acc gaa Ser Gly Phe Thr Ala Lys Leu Ala Gly Thr Glu Arg Gly Ile Thr Glu	1200						
			385		390		395	
80	ccg acg cca acc ttc tcc gct tgc ttc ggc gcg gca ttc ctg tcg ctg Pro Thr Pro Thr Phe Ser Ala Cys Phe Gly Ala Ala Phe Leu Ser Leu	1248						
			405		410		415	

cac ccg act cag tac gca gaa gtg ctg gtg aaa cgt atg cag gcg gcg 1296
 His Pro Thr Gln Tyr Ala Glu Val Leu Val Lys Arg Met Gln Ala Ala
 420 425 430

5 ggc gcg cag gct tat ctg gtt aac act ggc tgg aac ggc act ggc aaa 1344
 Gly Ala Gln Ala Tyr Leu Val Asn Thr Gly Trp Asn Gly Thr Gly Lys
 435 440 445

10 cgt atc tcg att aaa gat acc cgc gcc att atc gac gcc atc ctc aac 1392
 Arg Ile Ser Ile Lys Asp Thr Arg Ala Ile Ile Asp Ala Ile Leu Asn
 450 455 460

15 ggt tcg ctg gat aat gca gaa acc ttc act ctg ccg atg ttt aac ctg 1440
 Gly Ser Leu Asp Asn Ala Glu Thr Phe Thr Leu Pro Met Phe Asn Leu
 465 470 475 480

20 gcg atc cca acc gaa ctg ccg ggc gta gac acg aag att ctc gat ccg 1488
 Ala Ile Pro Thr Glu Leu Pro Gly Val Asp Thr Lys Ile Leu Asp Pro
 485 490 495

cgt aac acc tac gct tct ccg gaa cag tgg cag gaa aaa gcc gaa acc 1536
 Arg Asn Thr Tyr Ala Ser Pro Glu Gln Trp Gln Glu Lys Ala Glu Thr
 500 505 510

25 ctg gcg aaa ctg ttt atc gac aac ttc gat aaa tac acc gac acc cct 1584
 Leu Ala Lys Leu Phe Ile Asp Asn Phe Asp Lys Tyr Thr Asp Thr Pro
 515 520 525

30 gcg ggt gcc gcg ctg gta gcg gct ggt ccg aaa ctg taa 1623
 Ala Gly Ala Ala Leu Val Ala Ala Gly Pro Lys Leu
 530 535 540

35 <210> 2
 <211> 540
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

40 <400> 2
 Met Arg Val Asn Asn Gly Leu Thr Pro Gln Glu Leu Glu Ala Tyr Gly
 1 5 10 15

45 Ile Ser Asp Val His Asp Ile Val Tyr Asn Pro Ser Tyr Asp Leu Leu
 20 25 30

Tyr Gln Glu Glu Leu Asp Pro Ser Leu Thr Gly Tyr Glu Arg Gly Val
 35 40 45

50 Leu Thr Asn Leu Gly Ala Val Ala Val Asp Thr Gly Ile Phe Thr Gly
 50 55 60

Arg Ser Pro Lys Asp Lys Tyr Ile Val Arg Asp Asp Thr Thr Arg Asp
 65 70 75 80

55 Thr Phe Trp Trp Ala Asp Lys Gly Lys Gly Lys Asn Asp Asn Lys Pro
 85 90 95

60 Leu Ser Pro Glu Thr Trp Gln His Leu Lys Gly Leu Val Thr Arg Gln
 100 105 110

Leu Ser Gly Lys Arg Leu Phe Val Val Asp Ala Phe Cys Gly Ala Asn
 115 120 125

65 Pro Asp Thr Arg Leu Ser Val Arg Phe Ile Thr Glu Val Ala Trp Gln
 130 135 140

	Ala	His	Phe	Val	Lys	Asn	Met	Phe	Ile	Arg	Pro	Ser	Asp	Glu	Glu	Leu	145	150	155									160
5	Ala	Gly	Phe	Lys	Pro	Asp	Phe	Ile	Val	Met	Asn	Gly	Ala	Lys	Cys	Thr		165		170							175	
	Asn	Pro	Gln	Trp	Lys	Glu	Gln	Gly	Leu	Asn	Ser	Glu	Asn	Phe	Val	Ala		180		185						190		
10	Phe	Asn	Leu	Thr	Glu	Arg	Met	Gln	Leu	Ile	Gly	Gly	Thr	Trp	Tyr	Gly		195		200				205				
	Gly	Glu	Met	Lys	Lys	Gly	Met	Phe	Ser	Met	Met	Asn	Tyr	Leu	Leu	Pro		210		215				220				
15	Leu	Lys	Gly	Ile	Ala	Ser	Met	His	Cys	Ser	Ala	Asn	Val	Gly	Glu	Lys		225		230			235				240	
	Gly	Asp	Val	Ala	Val	Phe	Phe	Gly	Leu	Ser	Gly	Thr	Gly	Lys	Thr	Thr		245		250						255		
20	Leu	Ser	Thr	Asp	Pro	Lys	Arg	Arg	Leu	Ile	Gly	Asp	Asp	Glu	His	Gly		260		265					270			
	Trp	Asp	Asp	Asp	Gly	Val	Phe	Asn	Phe	Glu	Gly	Gly	Cys	Tyr	Ala	Lys		275		280				285				
25	Thr	Ile	Lys	Leu	Ser	Lys	Glu	Ala	Glu	Pro	Glu	Ile	Tyr	Asn	Ala	Ile		290		295				300				
30	Arg	Arg	Asp	Ala	Leu	Leu	Glu	Asn	Val	Thr	Val	Arg	Glu	Asp	Gly	Thr		305		310			315				320	
	Ile	Asp	Phe	Asp	Asp	Gly	Ser	Lys	Thr	Glu	Asn	Thr	Arg	Val	Ser	Tyr		325		330					335			
35	Pro	Ile	Tyr	His	Ile	Asp	Asn	Ile	Val	Lys	Pro	Val	Ser	Lys	Ala	Gly		340		345					350			
40	His	Ala	Thr	Lys	Val	Ile	Phe	Leu	Thr	Ala	Asp	Ala	Phe	Gly	Val	Leu		355		360				365				
	Pro	Pro	Val	Ser	Arg	Leu	Thr	Ala	Asp	Gln	Thr	Gln	Tyr	His	Phe	Leu		370		375				380				
45	Ser	Gly	Phe	Thr	Ala	Lys	Leu	Ala	Gly	Thr	Glu	Arg	Gly	Ile	Thr	Glu		385		390			395				400	
	Pro	Thr	Pro	Thr	Phe	Ser	Ala	Cys	Phe	Gly	Ala	Ala	Phe	Leu	Ser	Leu		405		410					415			
50	His	Pro	Thr	Gln	Tyr	Ala	Glu	Val	Leu	Val	Lys	Arg	Met	Gln	Ala	Ala		420		425					430			
	Gly	Ala	Gln	Ala	Tyr	Leu	Val	Asn	Thr	Gly	Trp	Asn	Gly	Thr	Gly	Lys		435		440				445				
55	Arg	Ile	Ser	Ile	Lys	Asp	Thr	Arg	Ala	Ile	Ile	Asp	Ala	Ile	Leu	Asn		450		455				460				
60	Gly	Ser	Leu	Asp	Asn	Ala	Glu	Thr	Phe	Thr	Leu	Pro	Met	Phe	Asn	Leu		465		470			475				480	
	Ala	Ile	Pro	Thr	Glu	Leu	Pro	Gly	Val	Asp	Thr	Lys	Ile	Leu	Asp	Pro		485		490						495		

Arg Asn Thr Tyr Ala Ser Pro Glu Gln Trp Gln Glu Lys Ala Glu Thr
 500 505 510

5 Leu Ala Lys Leu Phe Ile Asp Asn Phe Asp Lys Tyr Thr Asp Thr Pro
 515 520 525

Ala Gly Ala Ala Leu Val Ala Ala Gly Pro Lys Leu
 530 535 540

10

<210> 3
 <211> 1156
 <212> DNA

15 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1156)

20 <223> Mutagene DNA

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(35)

25 <223> Technische DNA/Reste Polylinker-Sequenz

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (36)..(522)

30 <223> Teil der 5'-Region (pck1) des pckA-Gens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (523)..(542)

35 <223> Technische DNA/Reste Polylinker Sequenz

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (543)..(1105)

40 <223> Teil der 3'-Region (pck2) des pckA-Gens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1106)..(1156)

45 <223> Technische DNA/Reste Polylinker Sequenz

<400> 3

ctagtaacgg cgcgcagtgt gctggaattc ggcttgatcc gagcctgaca ggttatgagc 60
 gcgggggtgtt aactaatctg ggtgccgttg ccgtcgatcac cgggatcttc accgggtcgtt 120
 50 caccaaaaaga taagtatatc gtccgtgacg ataccactcg cgatacttcc tgggtgggcag 180
 acaaaggcaa aggtaagaac gacaacaaac ctctctctcc ggaaacctgg cagcatctga 240
 aaggcctggt gaccaggcag ctttcgggca aacgtctgtt cgttgctcgac gctttctgtg 300
 gtgcgaaccc ggatactcgt ctttcggtcc gtttcatcac cgaagtggcc tggcaggcgc 360
 attttgtcaa aaacatgttt attcgcccga gcgatgaaga actggcaggt ttcaaaccag 420
 55 actttatcgt tatgaacggc gcgaagtgc ctaaccgcga gtggaaagaa cagggtctca 480
 actccgaaaa ctctgtggcg tttaacctga ccgagcgcac gcaagccgaa ttctgcagat 540
 cctgaagatg gcactatcga ctttgatgat gggtcaaaaa ccgagaacac ccgcgtttct 600
 tatccgatct atcacatcga taacattggt aagccggttt ccaaagcggg ccacgcgact 660
 aaggttatct tcctgactgc tgatgcttcc ggctgtgttc cgccggttcc tcgcctgact 720
 60 gccgatcaaa ccagtatca cttcctctct ggcttcaccg ccaaactggc cgggtactgag 780
 cgtggcatca ccgaaccgac gccaaccttc tccgcttgct tcggcgcggc attcctgtcg 840
 ctgcaccoga ctacgtacgc agaagtgtcg gtgaaacgta tgcaggcggc gggcgcgcgag 900
 gcttatcttg ttaactctgg ctggaacggc actggcaaac gtatctcgat taaagatacc 960
 cgcgcattta tcgacgccat cctcaacggg tcgctggata atgcagaaac cttcactctg 1020
 65 ccgatgttta acctggcgat cccaaccgaa ctgccgggag tagacacgaa gattctcgat 1080
 ccgcgtaaca cctacgcttc tccggaagcc gaattctgca gatatccatc aactggcggg 1140

ccgctcgagc atgcat

1156

5 <210> 4
 <211> 1294
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

 10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 <223> Startkodon des delta pckA-Allels

 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(598)
 <223> 5'-Region des delta pckA-Allels

 20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (599)..(618)
 <223> Technische DNA/Reste Polylinker-Sequenz

 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (619)..(1291)
 <223> 3'-Region des delta pckA-Allels

 30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1292)..(1294)
 <223> Stopkodon des delta pckA-Allels

 <400> 4
 35 atgcgcgtta acaatggttt gaccccgcaa gaactcgagg cttatggtat cagtgcgta 60
 catgatatcg tttaacaacc aagctacgac ctgctgtatc aggaagagct cgatccgagc 120
 ctgacagggt atgagcgcg ggtgttaact aatctgggtg ccgttgccgt cgataccggg 180
 atcttcaccg gtcgttcacc aaaagataag tatatcgccc gtgacgatac cactcgcgat 240
 actttctggt gggcagacaa aggcacaggt aagaacgaca acaaacctct ctctccggaa 300
 40 acctggcagc atctgaaagg cctgggtgacc aggcagcttt ccggcaaacg tctgttcggt 360
 gtcgacgctt tctgtggtgc gaacccggat actcgtcttt ccgtccggtt catcaccgaa 420
 gtggcctggc aggcgcattt tgtcaaaaac atgtttattc gcccagagcg tgaagaactg 480
 gcaggtttca aaccagactt tatcgttatg aacggcgcg agtgactaa cccgcagtgg 540
 aaagaacagg gtctcaactc cgaaaacttc gtggcggtta acctgaccga gcgcatgcaa 600
 45 gccgaattct gcagatcctg aagatggcac tatcgacttt gatgatggtt caaaaaccga 660
 gaacaccgac gtttcttatt cgatctatca catcgataac attgttaagc cggtttccaa 720
 agcggggccac gcgactaagg ttatcttcct gactgctgat gctttcggcg tgttgccgcc 780
 ggtttctcgc ctgactgccg atcaaaccga gtatcacttc ctctctggtt tcaccgcaa 840
 actggccggt actgagcgtg gcacaccgga accgacgcca accttctcgg cttgcttcgg 900
 50 cgcggcattc ctgtcgtgc acccgactca gtacgcagaa gtgctggtga aacgtatgca 960
 ggccggcggt gcgcaggctt atctgggtta cactggctgg aacggcactg gcaaacgtat 1020
 ctcgattaaa gatacccgcg ccattatcga cgccatcctc aacggttcgc tggataatgc 1080
 agaaaccttc actctgccga tgtttaacct ggcgatccca accgaactgc cgggcgtaga 1140
 cacgaagatt ctgacccgca gtaaaccta cgcttctccg gaacagtggc aggaaaaagc 1200
 55 cgaaaccttg gcgaaactgt ttatcgacaa cttcgataaa tacaccgaca cccctgcggg 1260
 tgccgcgctg gtacgcgctg gtccgaaact gtaa 1294

 60 <210> 5
 <211> 1248
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

 65 <220>
 <221> gene
 <222> (376)..(714)

```

<223> ORF ytfP

<220>
<221> gene
5 <222> Complement((461)..(727))
<223> ORF yjFA

<400> 5
10 ggcatgtcg caacaagctg ccttgtctta tttgctacgt ggacaagggc tggagagcga 60
   tcagagcgac agtgccggcaa tgacctcgat gctgattggt ttggggggtg cgcaaagtgg 120
   ccagattgtg ggtaaaatcg gcgagacggt tggcgtaagc aatttagcgc tcgacaccca 180
   gggagtaggc gactcctccc aggtagtggg cagcggctat gtattgccag gtctgcaagt 240
   gaaatacggc gtgggtatat ttgactctat agcaacactc acgttacgtt atcgccctgat 300
   gcctaagcta tatctggaag ccgtgtctgg ttagaccag gcaactggatt tgctctatca 360
   gttagagttt tagcaatgcg aatatttgtc tacggcagtt tacgccacaa acaaggcaac 420
   agtcaactga tgaccaatgc ccagttactg ggcgatttca gtatcgataa ctaccagttg 480
   tatagcctgg gccactatcc aggcgcagtt ccggggaacg gaacgggtaca cgggtgaagtt 540
   tatcgatttg acaacgccac gctggccgaa cttgatgcct tgcgcaccag gggcggtgaa 600
   tacgcgcgcc agttgattca gacgcgcgtac gggagtgcac ggatgtacgt ttatcaacga 660
   cccgtcgatg gattaaagct aattgaaagc ggcgactggg tagacaggga taagtaacca 720
   tatgcatacg ccaccttcgg gtggcggtgt tttttgcgag acgactcgca ttctgttttg 780
   taattccctc accttttgcg tttctctccg agccgctttc catatctatt aacgcataaa 840
   aaactctgct ggcattcaca aatgcgcagg ggtaaaacgt ttctgttagc accgtgagtt 900
   atactttgta taacttaagg aggtgcagat gcgtattacc ataaaaagat ggggggaacag 960
25 tgcaggtatg gtcattccca atatcgtaat gaaagaactt aacttacagc cggggcagag 1020
   cgtggaggcg caagtgaaga acaatcaact gattctgaca cccatctcca ggcgctactc 1080
   gcttgatgaa ctgctggcac agtgtgacat gaacgccgcg gaacttagcg agcaggatgt 1140
   ctggggtaaa tccacccctg cgggtgacga aatatggtaa agaaaagtga atttgaacgg 1200
30 ggagacattg tgctgggttg ctttgatcca gcaagcggcc atgaacag 1248

<210> 6
<211> 911
<212> DNA
35 <213> Escherichia coli

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(911)
40 <223> Deletion tragende ytfP-yjFA Region

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(383)
45 <223> 5'-Flanke der ytfP-yjFA Region

<220>
<221> misc_feature
<222> (384)..(911)
50 <223> 3'-Flanke der ytfP-yjFA Region

<220>
<221> misc_feature
<222> (376)..(378)
55 <223> ATG Kodon des trunkierten ORF ytfP

<220>
<221> misc_feature
<222> Complement((388)..(390))
60 <223> ATG Kodon des trunkierten ORF yjFA

<400> 6
65 ggcatgtcg caacaagctg ccttgtctta tttgctacgt ggacaagggc tggagagcga 60
   tcagagcgac agtgccggcaa tgacctcgat gctgattggt ttggggggtg cgcaaagtgg 120
   ccagattgtg ggtaaaatcg gcgagacggt tggcgtaagc aatttagcgc tcgacaccca 180
   gggagtaggc gactcctccc aggtagtggg cagcggctat gtattgccag gtctgcaagt 240

```

```

gaaatacggc gtgggtatat ttgactctat agcaaacactc acgttacgtt atcgccctgat 300
gcctaagcta tatctggaag ccgtgtcttg ttagaccag gcactggatt tgctctatca 360
gttcgagttt tagcaatgcg aattatgcat acgccacctt cgggtggcgt tgttttttgc 420
gagacgactc gcattctgtt ttgtaattcc ctcacctttt gcttttctct ccgagccgct 480
5  ttccatatct attaacgcat aaaaaactct gctggcattc acaaatgcgc aggggtaaaa 540
cgtttctctg agcaccgtga gttatacttt gtataactta aggagggtga gatgcgtatt 600
accataaaaa gatgggggaa cagtgcaggt atggtcattc ccaatatcgt aatgaaagaa 660
cttaacttac agccggggca gagcgtggag gcgcaagtga gcaacaatca actgattctg 720
acacccatct ccaggcgcta ctcgcttgat gaactgctgg cacagtgtga catgaacgcc 780
10 gcggaactta gcgagcagga tgtctggggg aaatccaccc ctgcgggtga cgaaatatgg 840
taaagaaaag tgaatttgaa cggggagaca ttgtgctggg tggctttgat ccagcaagcg 900
gccatgaaca g 911

15 <210> 7
    <211> 1158
    <212> DNA
    <213> Escherichia coli

20 <220>
    <221> misc_feature
    <222> (1)..(1158)
    <223> Deletion tragende ytfP-yjfa Region

25 <220>
    <221> misc_feature
    <222> (1)..(630)
    <223> 5'-Flanke der ytfP-yjfa Region

30 <220>
    <221> misc_feature
    <222> (631)..(1158)
    <223> 3'-Flanke der ytfP-yjfa Region

35 <220>
    <221> misc_feature
    <222> (376)..(378)
    <223> ATG Kodon des trunkierten ORF ytfP

40 <220>
    <221> misc_feature
    <222> Complement((635)..(637))
    <223> ATG Kodon des trunkierten ORF yjfa

45 <400> 7
    ggcgatgtcg caacaagctg ccttgtctta tttgctacgt ggacaagggc tggagagcga 60
    tcagagcgac agtgcggcaa tgacctcgat gctgattggg ttgggggttg cgcaaagtgg 120
    ccagattgtg ggtaaaatcg gcgagacggt tggcgtaagc aatttagcgc tcgacaccca 180
    gggagtaggc gactcctccc aggtagtggg cagcggctat gtattgccag gtctgcaagt 240
50  gaaatacggc gtgggtatat ttgactctat agcaaacactc acgttacgtt atcgccctgat 300
    gcctaagcta tatctggaag ccgtgtcttg ttagaccag gcactggatt tgctctatca 360
    gttcgagttt tagcaatgcg aatatttgtc tacggcagtt tacgccacaa acaaggcaac 420
    agtcaactga tgaccaatgc ccagttactg ggcgatttca gtatcgataa ctaccagttg 480
    tatagcctgg gccactatcc aggcgcagtt ccggggaacg gaacggtaca cgggtgaagt 540
55  tatcgatttg acaacgccac gctggccgaa cttgatgcct tgcgcaccag gggcggtgaa 600
    tacgcgcgcc agttgattca gacgcgctac tatgcatacg ccaccttcgg gtggcgttgt 660
    tttttgcgag acgactcgca ttctgttttg taattccctc accttttgcg tttctctccg 720
    agccgctttc catatctatt aacgcataaa aaactctgct ggcattcaca aatgcgcagg 780
    ggtaaaacgt ttcctgtagc accgtgagtt atactttgta taacttaagg aggtgcagat 840
60  gcgtattacc ataaaaagat gggggaacag tgcaggtatg gtcattccca atatcgtaat 900
    gaaagaactt aacttacagc cggggcagag cgtggaggcg caagtgaaga acaatcaact 960
    gattctgaca cccatctcca ggcgctactc gcttgatgaa ctgctggcac agtgtgacat 1020
    gaacgcgcg gaaacttagc agcaggatgt ctggggtaaa tccaccctcg cgggtgacga 1080
    aatatggtaa agaaaaagtg atttgaacgg ggagacattg tgctgggttg ctttgatcca 1140
65  gcaagcggcc atgaacag 1158

```

<210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 5 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer
 pckA'5'-1
 10
 <400> 8
 gatccgagcc tgacaggta 20

 15 <210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 20 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer
 pckA'5'-2
 <400> 9
 25 gcatgcgctc ggtcaggta 20

 <210> 10
 <211> 22
 30 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer
 35 pckA'3'-1
 <400> 10
 aggcctgaag atggcactat cg 22
 40
 <210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 45 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer
 pckA'3'-2
 50 <400> 11
 ccggagaagc gtaggtgtta 20

 <210> 12
 55 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 60 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer Gdh1
 <400> 12
 tgaacacttc tggcggtagc 20
 65
 <210> 13

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 5 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer Gdh2
 <400> 13
 10 cctcggcgaa gctaatatgg 20
 <210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 15 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer RhtC1
 20 <400> 14
 ctgttagcat cggcgaggca 20
 <210> 15
 25 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 30 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer RhtC2
 <400> 15
 gcatgttgat ggcatgacg 20
 35 <210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 40 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PrimerTdh1
 <400> 16
 45 tcgcgaccta taagtttggg 20
 <210> 17
 <211> 20
 50 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer Tdh2
 55 <400> 17
 aataccagcc cttgttcgtg 20
 60 <210> 18
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 65 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

ytfP-1

<400> 18

ggcgatgtcg caacaagctg

20

5

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

10 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer
ytfP-2

15

<400> 19

ctgttcacatgg ccgcttgctg

20

20

Patentansprüche

1. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
5 daß man folgende Schritte durchführt:
 - a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, in denen man zumindest das
10 pckA-Gen oder dafür kodierende Nukleotidsequenzen abschwächt, insbesondere ausschaltet,
 - b) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Bakterien und
15
 - c) Isolieren der L-Aminosäure, wobei man gegebenenfalls Bestandteile Fermentationsbrühe und die Biomasse in ihrer Gesamtheit oder zum Teil zusammen mit der L-Aminosäure als festes Produkt
20 isoliert.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß man Mikroorganismen einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der
25 gewünschten L-Aminosäure verstärkt.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß man Mikroorganismen einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet
30 sind, die die Bildung der gewünschten L-Aminosäure verringern.
4. Verfahren gemäß Anspruch 1,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß man die Expression des (der) Polynukleotides (e),
35 das (die) für das pckA-Gen kodiert (kodieren) abschwächt, insbesondere ausschaltet.

5. Verfahren gemäß Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die regulatorischen und/oder katalytischen
Eigenschaften des Polypeptids (Enzymprotein)
5 verringert, für das das Polynukleotid pckA kodiert.
6. Verfahren gemäß Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß man zur Herstellung von L-Aminosäuren
Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae
10 fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder
mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe:
- 6.1 das für die Aspartatkinase, die Homoserin-
Dehydrogenase, die Homoserinkinase und die
15 Threoninsynthase kodierende thrABC-Operon,
- 6.2 das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende pyc-
Gen,
- 6.3 das für die Phosphoenolpyruvat-Synthase kodierende
pps-Gen,
- 20 6.4 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase
kodierende ppc-Gen,
- 6.5 die für die Transhydrogenase kodierende Gene pntA
und pntB,
- 6.6 das Homoserinresistenz vermittelnde Gen rhtB,
- 25 6.7 das Threoninresistenz vermittelnde Gen rhtC, und
- 6.8 das für die Glutamat-Dehydrogenase kodierende
gdhA-Gen
- verstärkt, insbesondere überexprimiert.
7. Verfahren gemäß Anspruch 1,
30 dadurch gekennzeichnet,
daß man zur Herstellung von L-Aminosäuren

Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe:

- 5 7.1 das für die Threonin-Dehydrogenase kodierende tdh-Gen,
- 7.2 das für die Malat-Dehydrogenase kodierende mdh-Gen,
- 7.3 das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) yjfa,
- 10 7.4 das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) ytfp,
abschwächt, insbesondere ausschaltet oder die Expression verringert.

- 8. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, dadurch gekennzeichnet, daß man folgende Schritte durchführt:

- 20 a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierende Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, in denen man zumindest den offenen Leserahmen yjfa und/oder ytfp oder dafür kodierende Nukleotidsequenzen abschwächt, insbesondere ausschaltet,
- 25 b) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Bakterien und
- 30 c) Isolieren der L-Aminosäure, wobei man gegebenenfalls Bestandteile der Fermentationsbrühe und die Biomasse in ihre Gesamtheit oder zum Teil zusammen mit der L-Aminosäure als festes Produkt isoliert.

- 9. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß man L-Isoleucin, L-Valin, L-Lysin oder L-Threonin herstellt.

10. L-Aminosäuren produzierende Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, in denen mindestens das pckA-Gen oder dafür kodierende Nukleotidsequenzen abgeschwächt, insbesondere ausgeschaltet sind.
- 5 11. L-Aminosäuren produzierende Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae gemäß Anspruch 10, die zusätzlich ein oder mehrere der Merkmale ausgewählt aus der Gruppe: eine Resistenz gegen α -Amino- β -Hydroxyvaleriansäure, eine verstärkte Homoserin-Dehydrogenase I-Aspartatkinase I in der feed back
10 resistenten Form, eine gegebenenfalls kompensierbare partielle Bedürftigkeit für L-Isoleucin, eine abgeschwächte Threonindehydrogenase und die Fähigkeit zur Saccharose-Verwertung besitzen.
- 15 12. L-Aminosäuren produzierende Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae in denen mindestens der offene Leserahmen yjfa und/oder ytfP oder dafür kodierende Nukleotidsequenzen abgeschwächt, insbesondere ausgeschaltet sind.
- 20 13. L-Aminosäuren produzierende Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae gemäß Anspruch 12, die zusätzlich ein oder mehrere der Merkmale ausgewählt aus der Gruppe: eine Resistenz gegen α -Amino- β -Hydroxyvaleriansäure, eine verstärkte Homoserin-Dehydrogenase I-Aspartatkinase I in der feed back
25 resistenten Form, eine gegebenenfalls kompensierbare partielle Bedürftigkeit für L-Isoleucin, eine abgeschwächte Threonindehydrogenase und die Fähigkeit zur Saccharose-Verwertung besitzen.
- 30
14. Plasmid pMAK705 Δ pckA, das Teile der 5'-und der 3'-Region des pckA-Gens, entsprechend SEQ ID No. 3, enthält, dargestellt in Figur 1.
15. Plasmid pMAK705 Δ yjfa, das die 5'- und die 3'-Flanke der
35 ytfP-yjfa Region einschließlich sehr kurzer Reste der

- offenen Leserahmen yjfA- und des ytfP, entsprechend SEQ ID No. 6 enthält, dargestellt in Figur 2.
16. Plasmid pMAK705Δ90bp, das die 5'- und die 3'-Flanke der ytfP-yjfA Region einschließlich sehr kurzer Reste der offenen Leserahmen yjfA- und des ytfP, entsprechend SEQ ID No. 7 enthält, dargestellt in Figur 5.
17. Isoliertes Polynukleotid aus Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, enthaltend eine für die 5'- und 3'-Region des pckA-Gens kodierende Polynukleotidsequenz dargestellt in SEQ ID No. 4 insbesondere geeignet als Bestandteil von Plasmiden für die ortsspezifische Mutagenase des pckA-Gens
18. Isoliertes Polynukleotid aus Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, enthaltend die 5'- und 3'-Flanke der ytfP-yjfA Region, dargestellt in SEQ ID No. 6, insbesondere geeignet als Bestandteil von Plasmiden für die ortsspezifische Mutagenese des offenen Leserahmens ytfP und/oder yjfA.
19. L-Threonin produzierende Stämme der Familie Enterobacteriaceae, enthaltend eine Deletionsmutation im pckA-Gen entsprechend SEQ ID No. 4.
20. L-Threonin produzierende Stämme der Familie Enterobacteriaceae, enthaltend eine Deletionsmutation im offenen Leserahmen ytfP, entsprechend SEQ ID No. 6 oder 7
21. L-Threonin produzierende Stämme der Familie Enterobacteriaceae, enthaltend eine Deletionsmutation im offenen Leserahmen yjfA, entsprechend SEQ ID No. 6 oder 7
22. L-Threonin produzierende Stämme der Familie Enterobacteriaceae gemäß Anspruch 19, zusätzlich enthaltend eine Deletionsmutation im offenen Leserahmen ytfP, entsprechend SEQ ID No. 6 oder 7

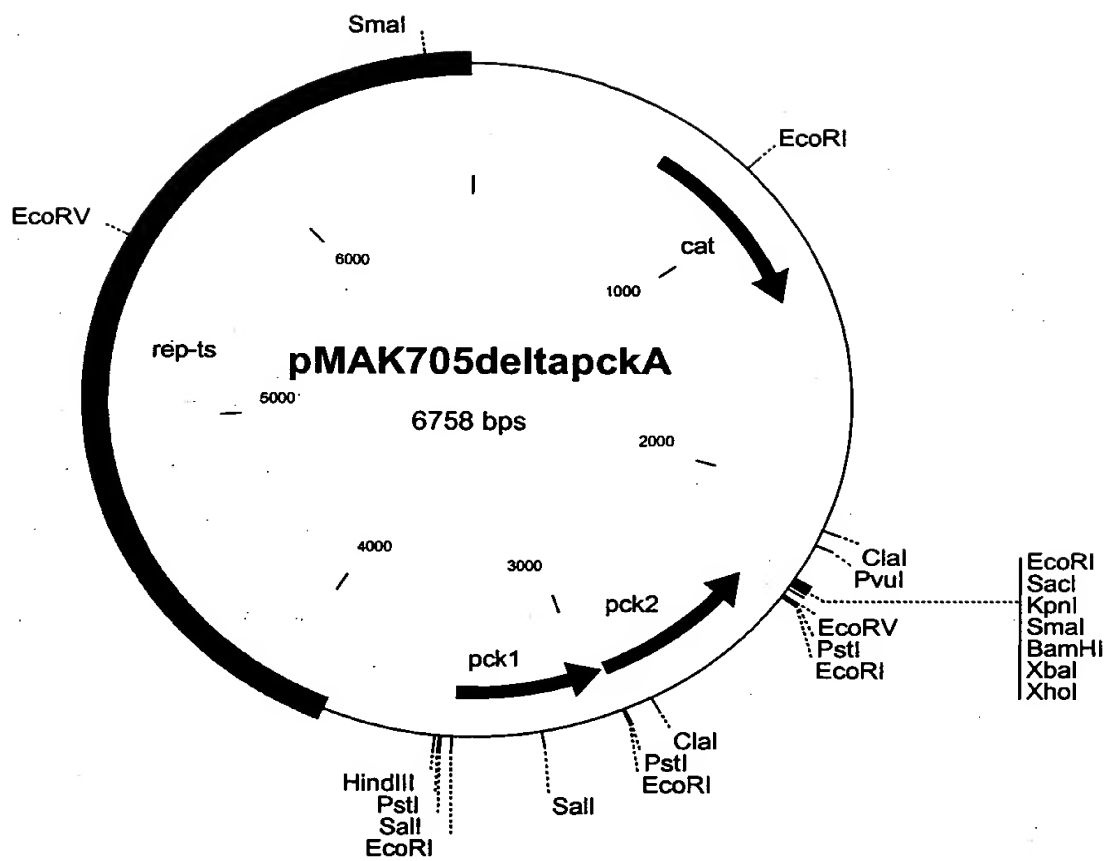
23. L-Threonin produzierende Stämme der Familie
Enterobacteriaceae gemäß Anspruch 19, zusätzlich
enthaltend eine Deletionsmutation im offenen Leserahmen
yjfA, entsprechend SEQ ID No. 6 oder 7.
- 5 24. L-Threonin produzierende Stämme der Familie
Enterobacteriaceae gemäß den Ansprüchen 19, 20 oder 21,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß sie ein oder mehrere der Merkmale ausgewählt aus
der Gruppe: eine Resistenz gegen α -Amino- β -
10 Hydroxyvaleriansäure, eine verstärkte Homoserin-
Dehydrogenase I-Aspartatkinase I in der feed back
resistenten Form, eine gegebenenfalls kompensierbare
partielle Bedürftigkeit für L-Isoleucin, eine
abgeschwächte Threonindehydrogenase und die Fähigkeit
15 zur Saccharose-Verwertung besitzen
25. Escherichia coli K-12 Stamm MG442 Δ pckA, hinterlegt unter
der Nummer DSM 13761 bei der Deutschen Sammlung für
Mikroorganismen und Zellkulturen.
- 20 26. Escherichia coli K-12 Stamm MG442 Δ 90yjfA, hinterlegt
unter der Nummer DSM 14289 bei der Deutschen Sammlung
für Mikroorganismen und Zellkulturen.
27. Escherichia coli K-12 Stamm B3996kur Δ tdhpckA/pVIC40,
hinterlegt unter der Nummer DSM 14150 bei der Deutschen
Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen.

**Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren
unter Verwendung von Stämmen der Familie Enterobacteriaceae**

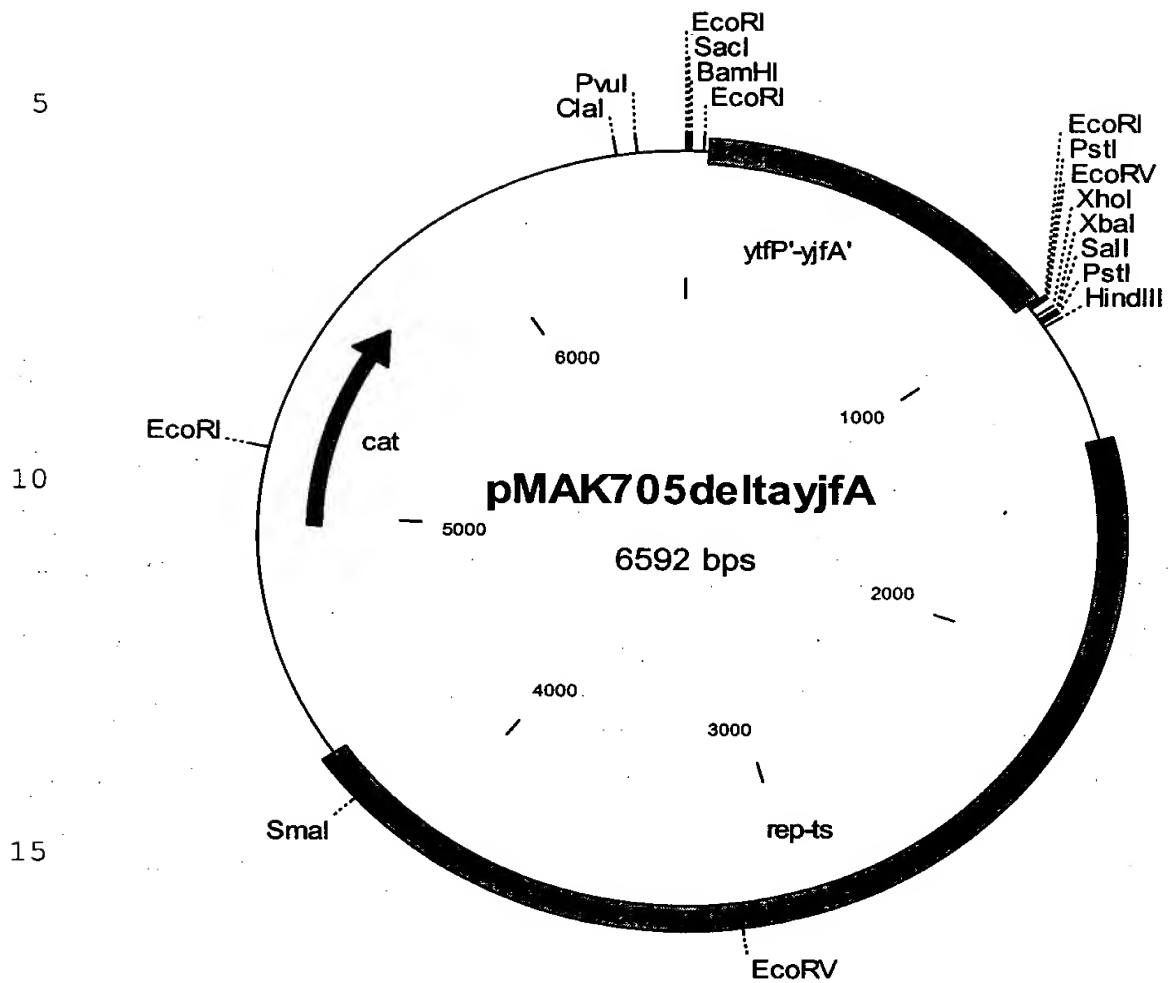
Zusammenfassung

- 5 Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren,
insbesondere L-Threonin,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man folgende Schritte durchführt:
- 10 a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure
produzierenden Mikroorganismen der Familie
Enterobacteriaceae, in denen man zumindest das
pckA-Gen und/oder die offenen Leserahmen yifA und
ytfP einzeln oder gemeinsam
15 abschwächt, insbesondere ausschaltet,
- b) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium oder in
den Zellen der Bakterien und
- 20 c) Isolieren der L-Aminosäure.

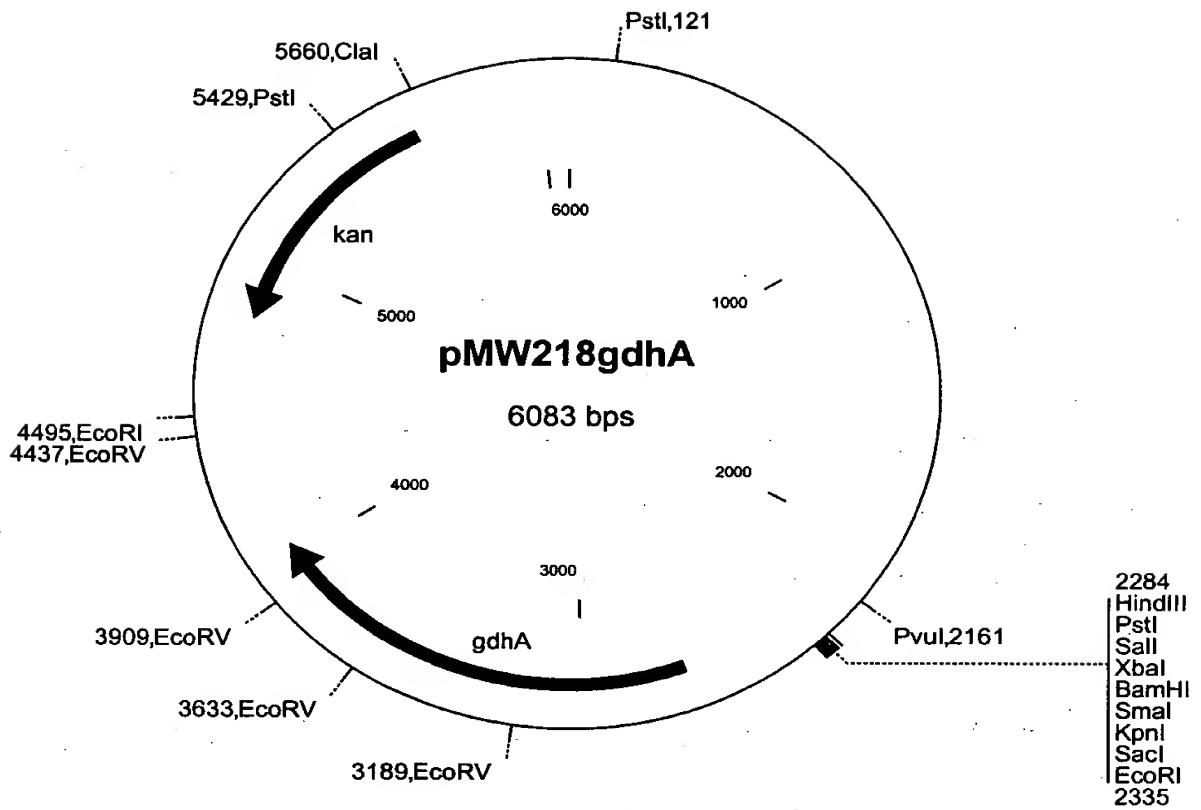
Figur 1:



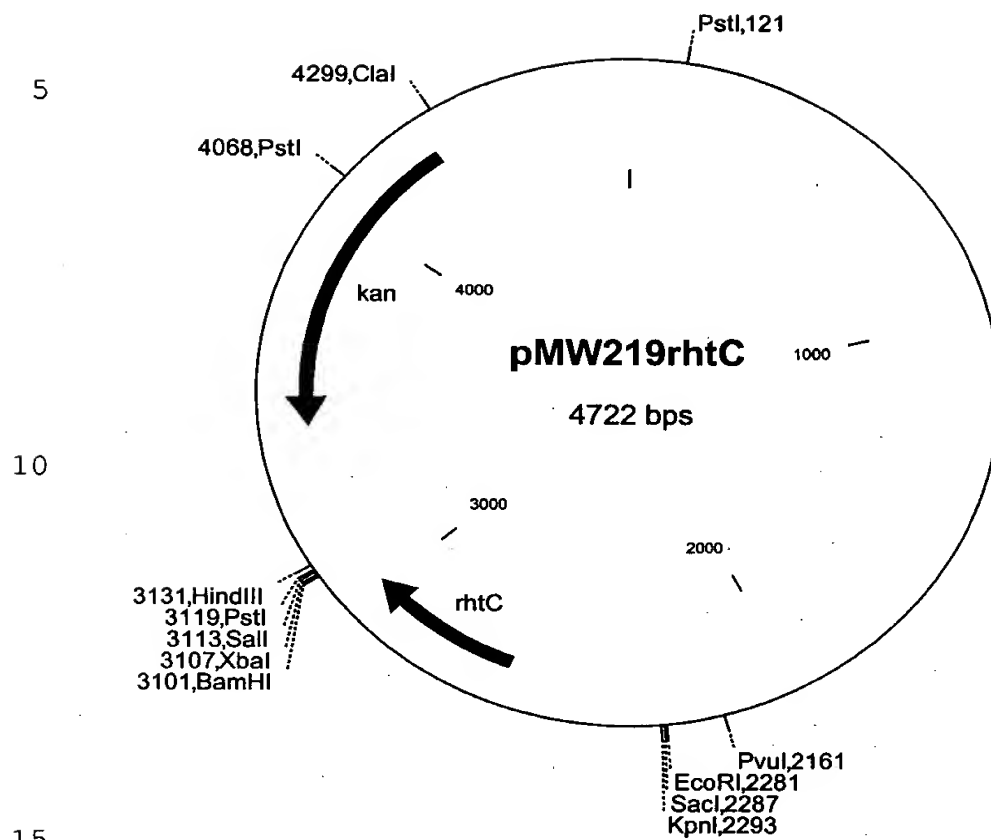
Figur 2:



Figur 3:



Figur 4:



Figur 5:

